

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**DESARROLLO DE MÉTODOS**

**PARA EL AISLAMIENTO Y LA DETECCIÓN**

**DE TOXINAS MARINAS**

**EN PRODUCTOS DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA**

**Tesis doctoral**

**María del Carmen Alfonso Méndez**

**Lugo, 2008**



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Facultad de Veterinaria  
Campus universitario  
27002 Lugo (Spain)  
Tel.: +34 982 252 242  
Fax: +34 982 252 195 · 982 252 242

Luis M. Botana López, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA

Que la tesis doctoral titulada *“Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura”*, recogida en la presente memoria, de la que es autora la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Santiago de Compostela María del Carmen Alfonso Méndez, ha sido realizada bajo su codirección y cumple las condiciones exigidas para que su autora pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela, otorgando su aprobación para la lectura y defensa de la misma.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 22 de Diciembre de 2008.

Luis M. Botana López  
Doctor en Farmacia  
Codirector de tesis

María del Carmen Alfonso Méndez



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Facultad de Veterinaria  
Campus universitario  
27002 Lugo (Spain)  
Tel.: +34 982 252 242  
Fax: +34 982 252 195 · 982 252 242

**M<sup>a</sup> Amparo Alfonso Rancaño**, Profesora Titular de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMA**

Que la tesis doctoral titulada *“Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura”*, recogida en la presente memoria, de la que es autora la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Santiago de Compostela María del Carmen Alfonso Méndez, ha sido realizada bajo su codirección y cumple las condiciones exigidas para que su autora pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela, otorgando su aprobación para la lectura y defensa de la misma.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 22 de Diciembre de 2008.

M<sup>a</sup> Amparo Alfonso Rancaño  
Doctora en Farmacia  
Codirectora de tesis

María del Carmen Alfonso Méndez

## *Agradecimientos*

*A Luis Botana por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí para llevar a cabo este trabajo.*

*A Amparo Alfonso por enseñarme cómo se deben realizar los experimentos, por la experiencia que me ha transmitido y por las discusiones productivas que hemos tenido.*

*A todos los investigadores que han colaborado en las publicaciones que forman parte de esta tesis por haber aportado resultados, muestras contaminadas o toxinas.*

*A todos los organismos que me han aportado financiación a lo largo de estos años.*

*A todas las personas que han formado parte de este laboratorio durante la realización de mi tesis por las veces que me han ayudado.*

*Al personal de la Facultad que ha hecho más grata mi estancia aquí y más fácil mi trabajo.*

*A Carmen, M<sup>a</sup> José, Tania y José Manuel por sus conversaciones y por los ratos, buenos y malos, que hemos pasado juntos.*

*A mis amigos por preocuparse por mí y estar conmigo, vayan bien o mal las cosas.*

*A mi familia por apoyarme en todo lo que hago y por quererme.*

*Abreviaturas*

AcOH:	ácido acético.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
AMPA:	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.
AMPc:	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.
AOAC:	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales.
APCI:	ionización química a presión atmosférica.
API:	ionización a presión atmosférica.
APPI:	fotoionización a presión atmosférica.
ASP:	toxinas amnésicas.
AZAs:	azaspirácidos.
C18:	grupo funcional n-octadecilsilil-.
C4:	grupo funcional n-butil-.
C8:	grupo funcional n-octilsilil-.
CCDs:	charge-coupled devices.
C-CTXs:	ciguatoxinas del Caribe.
CE:	Comunidad Europea.
CEE:	Comunidad Económica Europea.
CFP:	toxinas implicadas en la ciguatera.
CN:	grupo funcional cianopropilsilil-.
Cs:	N-sulfocarbamoil-11 hidroxisulfatotoxinas.
CTX:	ciguatoxina.
CTXs:	ciguatoxinas.
DA:	ácido domoico.
DSP:	toxinas diarreicas.
DTXs:	dinofisistoxinas.
EFSA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
ELISA:	enzimoinmunoensayos.
eq:	equivalente.
ESI:	ionización por electrospray.
F-actina:	actina filamentosa.
FAD:	flavina adenina dinucleótido oxidado.
FMN:	flavina mononucleótido oxidado.

FP:	polarización de la fluorescencia.
g:	gramo.
GbTXs:	gambiertoquinas.
GTXs:	gonyautoquinas.
h:	hora.
HAB:	floración algal nociva.
HIC:	cromatografía de interacción hidrofóbica.
HILIC:	cromatografía de interacción hidrofílica.
HPLC:	cromatografía líquida de alta eficacia.
I <sub>⊥</sub> :	intensidad de fluorescencia medida con el polarizador de emisión orientado perpendicularmente a la dirección de la luz polarizada de excitación.
i.p.:	intraperitoneal.
I <sub>  </sub> :	intensidad de fluorescencia medida con el polarizador de emisión orientado paralelamente a la dirección de la luz polarizada de excitación.
kg:	kilogramo.
LC/MS:	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
LED:	diodo emisor de luz.
m/z:	masa/carga.
MeOH:	metanol.
mg:	miligramo.
mP:	unidades de milipolarización.
MRM:	monitorización de múltiples reacciones.
MS/MS:	espectrometría de masas en tándem.
MS:	espectrometría de masas.
MTXs:	maitotoquinas.
N:	número de platos.
NADH:	nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
OA:	ácido okadaico.
ODS:	grupo funcional n-octadecilsilil-.



P:	unidades de polarización de la fluorescencia.
P <sub>0</sub> :	polarización fundamental.
PbTX:	brevetoxina.
PbTXs:	brevetoxinas.
P-CTXs:	ciguatoxinas del Pacífico.
PDE I:	fosfodiesterasa I.
PDE II:	fosfodiesterasa II.
PDEs:	fosfodiesterasas específicas de nucleótidos cíclicos 3',5'.
PEEK:	Material termoplástico con resistencia a la temperatura y excelente resistencia química.
PITX:	palitoxina.
PITXs:	palitoxinas.
PP1:	fosfatasas de proteínas en residuos de serina y treonina 1.
PP2A:	fosfatasas de proteínas en residuos de serina y treonina 2A.
PSP:	toxinas paralizantes.
PTXs:	pectenotoxinas.
R:	constante universal de los gases ideales.
s:	segundo.
SIR:	monitorización de un sólo ión.
SPE:	extracción en fase sólida.
STX:	saxitoxina.
STXs:	saxitoxinas.
T:	temperatura.
TOF:	analizadores de masa de tiempo de vuelo.
TTX:	tetrodotoxina.
UPLC:	cromatografía líquida de ultra eficacia.
V:	volumen.
YTX:	yessotoxina.
YTXs:	yessotoxinas.
$\alpha$ :	ángulo entre el dipolo de excitación y el de emisión.
$\mu$ :	viscosidad.
$\mu\text{g}$ :	microgramo.

$\theta$ :	tiempo de correlación rotacional.
$\tau$ :	tiempo de vida en el estado excitado.
$^{\circ}$ :	grado.
$^{\circ}\text{C}$ :	grado centígrado.

## *Índice*

1. Introducción.....	1
1.1. Ficotoxinas marinas.....	2
1.2. Polarización de la fluorescencia (FP).....	28
1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	42
1.4. Espectrometría de masas.....	51
2. Objetivo.....	59
3. Publicaciones.....	61
3.1. Presentación.....	62
3.2. Resumen.....	105
4. Conclusiones.....	109
5. Bibliografía.....	111

## ***1. Introducción***

## **1.1. Ficotoxinas marinas.**

### **1.1.1. Introducción.**

Las ficotoxinas marinas son metabolitos secundarios que producen ciertas microalgas del ecosistema marino. Su función no está clara ya que no tienen un papel determinado en la economía de los organismos productores pero presentan actividades muy específicas en los mamíferos. Sin embargo, es probable que se utilicen para competir por el espacio, vencer a las presas o defenderse del crecimiento excesivo de otros organismos [13].

La abundancia de las microalgas en un determinado lugar se ve influenciada por factores primarios o limitantes, como cambios en la iluminación y la disponibilidad de nutrientes, y factores secundarios o reguladores, como cambios en la salinidad o la temperatura y depredación por el zooplancton herbívoro. Habitualmente esta variación en la abundancia afecta a varias especies de microalgas a la vez; sin embargo en casos determinados se produce la proliferación masiva de una especie en particular a expensas de las restantes. De las casi 4000 especies marinas del fitoplancton microscópico que existen, unas 300 pueden proliferar en número tan alto que alcancen densidades de millones de células por litro de agua, siendo tóxicas alrededor de 60 de ellas [58]. Esa alta densidad puede llegar a modificar la coloración del agua y provocar efectos luminiscentes observables por la noche. Si esta proliferación es de fitoplancton tóxico recibe el nombre de floración algal nociva (HAB, harmful algal bloom), si bien de forma coloquial se le denomina marea roja. Hay que tener en cuenta que existen muchas floraciones algales que son beneficiosas para la acuicultura y los recursos marinos, de hecho se cultivan a escala industrial varias microalgas que sirven tanto para alimento de peces, moluscos y crustáceos como para aislar y purificar compuestos químicos naturales de uso farmacéutico.

Las mareas rojas ocurren cada vez con mayor frecuencia y en áreas más extensas del planeta, causando un gran número de intoxicaciones y graves perjuicios económicos en todas las actividades relacionadas con los productos de la pesca,

desde los productores primarios hasta los procesadores industriales. Existen múltiples explicaciones a este hecho como pueden ser las inusuales condiciones climáticas, la mayor movilidad de sustancias húmicas y metales desde el suelo debido a la deforestación y a la lluvia ácida, el mayor uso de aguas costeras para la acuicultura, la transferencia de moluscos de unas áreas a otras, la eutrofización cultural debido a basuras domésticas, industriales y de la agricultura,... Además hay que considerar la posibilidad de que el aumento sólo se deba a un mayor control debido a la preocupación científica y de la población por este tema.

Existen tres clases de algas unicelulares productoras de ficotoxinas: los dinoflagelados, con unas pocas docenas de especies tóxicas, las diatomeas, concretamente el género *Pseudonitzschia*, y las cianobacterias, con especies y cepas productoras de toxinas en casi todos los géneros [14].

Las ficotoxinas marinas pueden producir episodios tóxicos en humanos, debido a su presencia en diversos alimentos. El principal riesgo lo representan los moluscos filtradores, puesto que su forma de alimentación implica la filtración de grandes volúmenes de agua, facilitándose así la concentración de las toxinas en sus tejidos. En este grupo cabe destacar a ostras, mejillones, vieiras y almejas. Existen otros alimentos como ciertos pescados, tortugas, cangrejos y algas que también pueden contener ficotoxinas, pero tienen menor importancia porque suelen presentar menores cantidades y su consumo a nivel mundial es menor.

Existen distintos tipos de clasificaciones de las ficotoxinas marinas, que se revisan continuamente debido al aislamiento y descripción de nuevos metabolitos tóxicos, con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. Una de las más empleadas se basa en los síntomas tóxicos producidos en humanos, distinguiéndose cinco grupos de toxinas: paralizantes, diarreicas, neurotóxicas, implicadas en la ciguatera y amnésicas. Además hay otras ficotoxinas que no se pueden incluir en los grupos anteriores, como pectenotoxinas, azaspirácidos, yessotoxinas, maitotoxinas, palitoxinas,... Para realizar una breve descripción de cada uno de los grupos de toxinas se utiliza la clasificación de la tabla 1.

GRUPO	TOXINAS
Toxinas paralizantes (PSP)	Saxitoxinas (STXs) Gonyautoxinas (GTXs) N-sulfocarbamoil-11 hidroxisulfatotoxinas (Cs)
Toxinas diarreicas (DSP)	Ácido okadaico (OA) Dinofisistoxinas (DTXs)
Toxinas lipofílicas	Pectenotoxinas (PTXs) Yessotoxinas (YTXs)
Toxinas amnésicas (ASP)	Ácido domoico (DA) y derivados
Toxinas neurotóxicas no PSP	Toxinas implicadas en la ciguatera (CFP) Maitotoxinas (MTXs) Brevetoxinas (PbTXs) Iminas cíclicas Policavernósidos y gambierol
Palitoxinas (PITXs)	Palitoxina (PITX) Ostreocina Ovatatoxina
Azaspirácidos (AZAs)	Azaspirácidos (AZAs)
Otras toxinas	Tetrodotoxina (TTX) Toxinas producidas por <i>Pfiesteria</i> spp. Toxinas producidas por cianobacterias

Tabla 1. Clasificación de las ficotoxinas marinas.

### 1.1.2. Toxinas paralizantes (PSP).

Las toxinas paralizantes (PSP) son un grupo de ficotoxinas de elevada distribución que desde el punto de vista estructural se caracterizan por ser tetrahidropurinas. Estas toxinas se dividen en cuatro subgrupos en función de los sustituyentes que presenta esta estructura común: carbamato, sulfocarbamoil, decarbamoil y deoxidecarbamoil. Estos subgrupos presentan diferente toxicidad, siendo el carbamato el más tóxico, seguido por el decarbamoil con una potencia intermedia y finalmente los dos restantes con menor toxicidad [80]. Otra forma habitual de clasificar las PSP es en función de la carga neta que presentan a pH 7, existiendo en este caso tres grupos: las saxitoxinas (STXs), con carga neta de +2, las gonyautoxinas (GTXs), con carga neta de +1, y las N-sulfocarbamoil-11 hidroxisulfatotoxinas (Cs), sin carga [144]. El más representativo de los compuestos de este grupo es la saxitoxina, por ser el más estudiado y el primero en ser aislado, a partir de la almeja *Saxidomus giganteus*, de la que recibe su nombre [48].

Las PSP son producidas por varios géneros de dinoflagelados y una especie de algas verde-azuladas. Entre los primeros destacan múltiples especies del género



*Alexandrium*, el *Pyrodinium bahamense* y el *Gymnodinium catenatum*. En cuanto a la segunda, se trata de la *Aphanazomenon flos-aquae* [106].

Los principales portadores de estas toxinas son los moluscos bivalvos, incluyendo mejillones, almejas y, en menor grado, ostras, vieiras y berberechos. Una vez que estas variedades se alimentan de los dinoflagelados, las toxinas adquiridas se pueden conservar en varias zonas de los animales y distribuirse de manera variable a lo largo del tiempo, pudiendo también sufrir transformaciones dentro del organismo receptor.

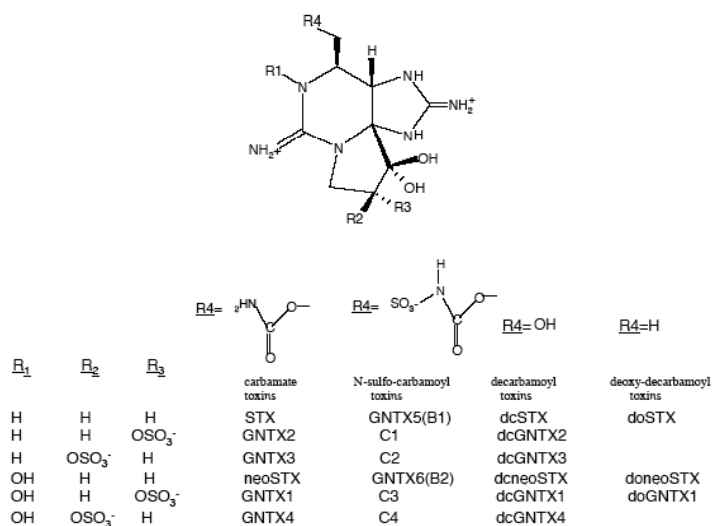


Figura 1. Estructura de algunas toxinas PSP.

El mecanismo de acción de este tipo de toxinas es similar al de la tetrodotoxina. Se unen de forma específica y reversible al sitio 1 del canal de sodio dependiente de voltaje, situándose en su parte externa e inhibiendo su apertura. De esta forma disminuyen o impiden la propagación de los impulsos nerviosos.

Los síntomas clínicos de una intoxicación leve debida a toxinas PSP incluyen hormigueo alrededor de los labios, que se extiende gradualmente a la cara y al cuello, picores en los dedos de las manos y de los pies, dolor de cabeza, vértigo, náuseas, vómitos y diarrea. En una intoxicación moderadamente severa se observa parestesia en brazos y piernas, mareos, habla incoherente, ataxia, falta de coordinación motora y, en ciertos casos, hipotensión. Los síntomas respiratorios

comienzan como una rigidez en torno a la garganta, pudiendo producirse la muerte por parálisis respiratoria [48, 80].

### 1.1.3. Toxinas diarreicas (DSP).

El grupo de las toxinas diarreicas (DSP) se consideró en un principio constituido por una gran variedad de toxinas, con la característica común de ser extraídas de moluscos contaminados utilizando disolventes orgánicos. Hoy en día, sin embargo, se considera que este grupo está formado únicamente por el ácido okadaico (OA) y sus derivados, que reciben el nombre de dinofisistoxinas (DTXs), siendo todos ellos compuestos polietéreos liposolubles. Dentro de las DTXs se pueden diferenciar los derivados “libres” (DTX1 y DTX2) y los esterificados (DTX3 en moluscos y DTX4-6 y ésteres diol en microalgas) [65, 127, 152, 154]. Se ha postulado que la esterificación es una forma de eliminar la toxicidad de las toxinas libres en los organismos que las producen y en los moluscos que las ingieren.

OA y DTXs son producidos por dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. [59, 176], habiendo sido también detectados en *Protoperidinium oceanicum* y en *P. pellucidum*, debido probablemente a que se pueden alimentar de *Dinophysis* spp. También se ha demostrado que *Phalacroma rotundatum* produce OA, DTX1 y DTX2 [21].

Las DSP se acumulan en mejillones, vieiras, almejas y ostras, por este orden. De hecho los mejillones son los moluscos contaminados más habitualmente, dependiendo de la profundidad a la que crezcan (mayor toxicidad a menor profundidad) [13]. Estas toxinas también pueden aparecer en los peces que se alimentan a partir de estos moluscos o del fitoplancton, acumuladas en sus tejidos grasos. Es probable que los gasterópodos y los crustáceos puedan contaminarse debido a la cadena trófica marina, aunque no existen datos al respecto [145].

Se ha demostrado que OA, DTX1 y DTX2 son inhibidores específicos de las fosfatasas de proteínas de residuos de serina y de treonina PP1 y PP2A, siendo la PP2A 200 veces más inhibida que la PP1. Estas fosfatasas están implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares ya que modulan el grado de fosforilación

o defosforilación de las proteínas [12, 41]. Por ejemplo, se ha sugerido que la diarrea en humanos es causada por la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio por las células intestinales, o bien por una excesiva fosforilación de las partes del citoesqueleto que regulan la permeabilidad a los solutos, produciéndose una pérdida pasiva de fluidos [45, 164]. Se han realizado estudios sobre la inhibición de PP2A y PP1 por los restantes derivados del OA, observándose que la presencia del grupo carboxílico del carbono 1 es esencial para que se produzca [158].

Tanto el OA como la DTX1 son promotores tumorales en estudios realizados con animales [50] y el OA presenta además una marcada actividad mutagénica [44].

Las toxinas DSP producen en humanos cuadros agudos de sintomatología gastrointestinal con diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal, sin haberse producido muertes por este motivo hasta la actualidad. Los síntomas aparecen entre 30 minutos y unas pocas horas después de la ingestión de los moluscos contaminados y cursan con una recuperación total en tres días. La intensidad de los síntomas depende de la dosis ingerida y generalmente no se necesita hospitalización [48]. Por otro lado, se ha determinado una relación entre la existencia de moluscos contaminados en las costas francesas y el desarrollo de cáncer de colon en los habitantes de dichas regiones [28].

#### **1.1.4. Toxinas lipofílicas.**

En este grupo de toxinas se incluyen las pectenotoxinas (PTXs) y las yessotoxinas (YTXs), inicialmente consideradas como toxinas diarreicas por ser extraídas de los moluscos contaminados junto con el OA y las DTXs. Sin embargo, la ausencia de sintomatología gastrointestinal después de su ingestión aconsejó su exclusión del grupo de las DSP.

##### **1.1.4.1. Pectenotoxinas (PTXs).**

Las pectenotoxinas (PTXs) toman su nombre de la vieira *Patinopecten yessoensis*, de la cual fueron aisladas por primera vez [184, 185]. Su estructura

recuerda a la del OA por poseer igual que éste éteres cíclicos y un grupo carboxílico. Sin embargo, en la mayor parte de las PTXs el residuo carboxílico se encuentra en forma de lactona macrocíclica. Hasta el momento se han aislado más de 14 compuestos que se diferencian por los radicales y por su disposición espacial [155]. También existen derivados ácidos de la PTX2 (concretamente el ácido seco PTX2, su epímero 7-epi-PTX2 [29] y sus ésteres recientemente aislados [177]) que se caracterizan porque el anillo lactona ha sido hidrolizado.

Se cree que los organismos productores de las PTXs son varias especies del género *Dinophysis*, si bien algunos análogos como la PTX6 se forman a partir de la PTX2 en tejidos de moluscos [153]. También se han detectado PTXs en mareas de *Protoperidinium* spp. que se estaban alimentando de *Dinophysis* spp. [103]. La presencia de los análogos ácidos de las PTXs en extractos de dinoflagelados se considera que no es significativa, a no ser que aparezcan como resultado de la hidrólisis de las PTXs por enzimas liberados de células dañadas [98].

Las PTXs se acumulan en los mismos moluscos que las DSP, aunque por el momento no hay muchos datos debido a que la determinación de PTXs de forma aislada es un hecho reciente.

Las PTXs no inhiben a las fosfatasa de proteínas PP2A y PP1 [46, 97] y no se conoce su diana intracelular. Sin embargo, se ha demostrado un efecto sobre el citoesqueleto de actina [5, 6, 89, 150].

Se informó de dos incidentes con moluscos contaminados con PTXs que cursaron con náuseas, vómitos y diarrea [18]. En ambos casos los moluscos contaminados contenían ácido seco PTX2. Sin embargo, después de los bioensayos realizados en ratones y de un nuevo análisis de las muestras contaminadas se llegó a la conclusión de que los incidentes fueron provocados por ésteres de OA [19].

#### 1.1.4.2. Yessotoxinas (YTXs).

La yessotoxina (YTX) es una toxina policíclica de naturaleza etérea originariamente aislada a partir de las glándulas digestivas de la vieira *Patinopecten yessoensis* en el transcurso de una marea roja de tipo diarreico en Japón [113]. Inicialmente la YTX y sus análogos (YTXs) se clasificaron dentro del grupo de las

toxinas diarreicas porque eran extraídas de los moluscos junto con el OA y las DTXs [113]. Estudios posteriores han demostrado que las YTXs deben ser consideradas un nuevo grupo de toxinas marinas, ya que no producen diarrea y tienen diferente mecanismo de acción [117] y diferente origen biogenético que las toxinas diarreicas.

La YTX es producida por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* [139], *Lingulodinium polyedrum* [33] y *Gonyaulax spinifera* [108]. Se trata de una molécula formada por 11 anillos etéreos adyacentes, una cadena lateral insaturada terminal y dos grupos sulfato [34]. Mientras que el esqueleto carbonado es liposoluble, estos dos grupos proporcionan a la molécula características anfifílicas [186], siendo la más polar de las toxinas lipofílicas.

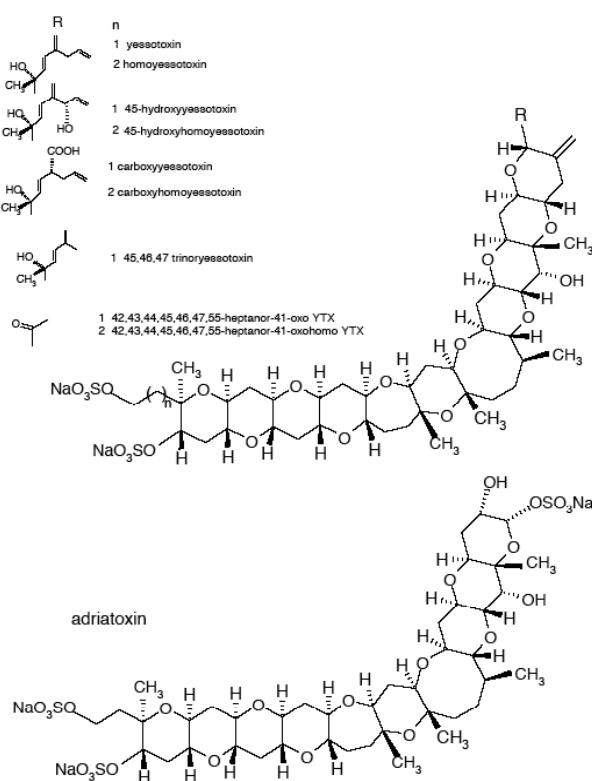


Figura 2. Estructura de algunas YTXs.

Se han identificado muchos análogos de YTX en microalgas y en moluscos, entre otros trinorYTX y 45-hidroxiYTX [138], homoYTX y su derivado 45-hidroxihomoYTX [140], adriatoxina [25], 1-desulfoYTX [30] y carboxiYTX [26].

También se han caracterizado algunos análogos que portan como cadena lateral una o más pentosas [78, 149] y se han descrito más de 90 análogos mediante ensayos de espectrometría de masas, muchos de ellos con una estructura desconocida hasta el momento [104]. Además se ha aislado otro posible análogo a partir de la especie *Coolia monotis*, denominado cooliatoxina [63], con el mismo peso molecular que la 1-desulfoYTX; la falta de información estructural y toxicológica hace imposible confirmar su relación con las YTXs o bien con las toxinas asociadas a la ciguatera.

Las YTXs aparecen principalmente en vieiras y mejillones, acumulándose en las glándulas digestivas de estos moluscos, pero pudiendo existir también en el tejido muscular.

Actualmente se están investigando la toxicología y la farmacología de la YTX. En experimentos realizados con ratones se ha observado que su inyección intraperitoneal (i.p.) produce una elevada letalidad, mientras que su administración oral no induce la muerte incluso a elevadas dosis [117], esto se debe a que el carácter anfifílico de la molécula influye en su absorción en el tracto intestinal.

Algunos autores han sugerido que el órgano diana después de la administración i.p. es el corazón [160], mientras que otros consideran que la YTX está implicada en desórdenes neurológicos y que su principal diana es el timo [49]. Por otro lado, la administración de YTX a linfocitos humanos ocasiona un incremento en la concentración citosólica de calcio [31] y un aumento de la actividad de las fosfodiesterasas específicas de nucleótidos cíclicos 3',5' [1]. De hecho, utilizando un biosensor óptico se ha demostrado que se produce una unión entre dichas proteínas y la YTX [119]. También se ha investigado la actividad de los distintos análogos en líneas tumorales MCF-7. Se ha observado que la modificación estructural presente en la homoYTX no cambia la actividad de la toxina, mientras que la estructura de la cadena lateral del carbono 9 parece esencial, de tal manera que la hidroxihomoYTX y la carboxiYTX presentan menor actividad que la YTX [43]. Estos datos han sido confirmados a través de estudios cinéticos de la unión entre fosfodiesterasas y YTX, hidroxihomoYTX y carboxihomoYTX, que prueban la menor afinidad entre dichas proteínas y los dos últimos análogos [120].

No se conoce cuál es la sintomatología específica de las YTXs, si es que existe, pues hasta la fecha siempre han aparecido asociadas a toxinas DSP, originando sintomatología gastrointestinal.

### 1.1.5. Toxinas amnésicas (ASP).

El grupo de las toxinas amnésicas (ASP) está formado únicamente por el ácido domoico (DA) y sus isómeros geométricos, algunos aislados en algas y otros en tejidos de molusco [129, 178]. El DA es un ácido tricarboxílico análogo del aminoácido neurotransmisor excitador L-glutamato, tiene carácter ácido, naturaleza cristalina, es soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos [159]. Se sabe que los isómeros geométricos (ácidos isodomoicos A, B, C, D, E, F, G y H) pueden generarse tras una breve exposición del DA a la luz ultravioleta y son menos tóxicos que éste debido a su menor fuerza de enlace a las proteínas receptoras neuronales [48]. Existe otro compuesto que forma parte de este grupo (el C5'-diasterómero), cuya formación se favorece con calentamiento y que presenta casi la misma eficacia de unión que el DA [178].

El DA fue originariamente aislado de las algas rojas *Chondria armata*, *Alsidium corallinum* y *Amphora coffaeiformis* [96, 129, 161]. Se ha postulado que sus productores son varias diatomeas del género *Pseudonitzschia*, lo que posteriormente ha sido probado mediante análisis durante los episodios tóxicos y en cultivos de laboratorio [60].

Los episodios tóxicos detectados de DA se han debido al consumo de mejillones, almejas, navajas y vieiras. También se ha encontrado DA en cangrejos, posiblemente debido a la actividad depredadora de éstos sobre las almejas, y en anchoas y caballas, consumidores de fitoplancton en caso de que no existan otras fuentes de alimento. Estos episodios han causado la muerte de animales carnívoros, como pelícanos [146] o leones de mar [85], debido al consumo de caballas o anchoas contaminadas.

El DA interfiere en la transmisión sináptica e interactúa con los receptores de aminoácidos excitadores. Los principales aminoácidos de este tipo son el L-

glutamato y el L-aspartato, y los principales receptores sobre los que actúan son el de NMDA (N-metil-D-aspartato), el de AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) y el de kainato. El DA es un análogo del glutamato y por ello se une a dichos receptores, ocasionando un estado de hiperexcitabilidad inicial, seguido de un efecto neurotóxico. Tiene dos lugares de acción principales en el sistema nervioso central: la zona del hipocampo implicada en el aprendizaje y el procesamiento de la memoria y la zona que controla la función visceral [121]. También afecta al sistema nervioso periférico, en el que se observa una neuropatía aguda y no progresiva, con alteración de los axones de las motoneuronas.

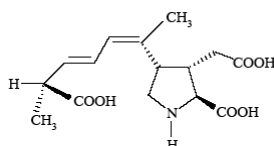


Figura 3. Estructura del DA.

El DA es tóxico en humanos tanto para el sistema nervioso central como para el periférico. El consumo de esta toxina ocasiona un síndrome que recibe el nombre de intoxicación amnésica e incluye vómitos, náuseas, diarrea y calambres abdominales en las 3-5 horas posteriores a la ingestión del alimento [48]. En casos graves, y durante las primeras 48 horas, aparecen dolor de cabeza, mareos, confusión, desorientación, pérdida de la memoria a corto plazo, debilidad motora, temblores, letargia, arritmias cardíacas y coma. Meses después de la intoxicación puede existir atrofia distal y ligera debilidad de las extremidades y un año más tarde deficiencias en la memoria a corto plazo, debido posiblemente a la degeneración de las neuronas. Todos estos síntomas son más intensos en personas con enfermedades renales previas [128].



### 1.1.6. Toxinas neurotóxicas no PSP.

#### 1.1.6.1. Toxinas implicadas en la ciguatera (CFP).

La ciguatera es una intoxicación que se conoce desde hace siglos, cuyas áreas endémicas son las regiones insulares tropicales y subtropicales de los océanos Pacífico e Índico y la región del Caribe, si bien se ha detectado en otros lugares. El nombre de ciguatera procede del nombre común de la primera especie identificada como causante de la intoxicación, el molusco *Turbo pica*, que recibe el nombre de cigua en Cuba [48].

Químicamente las ciguatoxinas (CTXs) son compuestos polietéreos, solubles en lípidos y consistentes en 13 ó 14 anillos fusionados mediante enlaces éter que generan una estructura rígida. Se supone que se originan en los peces debido a la biotransformación de sus precursores que son las gambiertoxinas (GbTXs) [87, 88], si bien actualmente el término CTXs se utiliza englobando a las GbTXs [187]. Se han caracterizado varios compuestos dentro de este grupo: una parte procede del Caribe (C-CTXs) y la otra del Pacífico (P-CTXs).

El organismo productor de estas toxinas es el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, quien también produce maitotoxinas. Sólo algunas de sus variedades producen CTXs, que se acumulan en el hígado, músculos, piel y huesos de peces carnívoros [24]. La diferencia entre las toxinas del Caribe y las del Pacífico se debe probablemente a diferentes variedades del dinoflagelado origen, que se circunscribe a latitudes entre 32° Norte y 32° Sur [92].

Se han detectado muchas especies y familias de peces implicadas en la ciguatera, tanto herbívoros como carnívoros, por ejemplo caballas, atunes y barracudas. Además existen otros organismos acuáticos que contienen CTXs, como los caracoles marinos, las gambas o los cangrejos. En todos los casos las mayores concentraciones de toxinas se dan en las vísceras, particularmente el hígado, el bazo y el riñón, siendo menores en otros tejidos como los huesos [48].

Las CTXs actúan directamente sobre las células excitables, uniéndose a los canales de sodio dependientes de voltaje y produciendo su apertura en condiciones de reposo. Esto se traduce en una despolarización celular y en la aparición de

potenciales de acción espontáneos en células excitables. Concretamente se ha postulado que se unen al sitio 5 del canal de sodio, igual que las brevetoxinas [91].

En humanos los síntomas clínicos que pueden aparecer se dividen en dos tipos: gastrointestinales y neurológicos. Los síntomas gastrointestinales incluyen vómitos, diarrea, náuseas y dolor abdominal y ocurren típicamente al comienzo de la enfermedad. Los síntomas neurológicos se producen siempre e incluyen hormigueo en labios, manos y pies, percepción térmica alterada y una gran picazón de la piel. En el 90% de los casos también se observa una profunda fatiga. Pueden aparecer dolores musculares y dentales, o trastornos como depresión o ansiedad. Los casos severos pueden implicar hipotensión, bradicardia, dificultades respiratorias y parálisis, pero las muertes son poco probables [92].

Se observa una variación geográfica de los síntomas predominando los neurológicos en el Pacífico y los gastrointestinales en el Caribe, lo cual se relaciona con las diferentes toxinas existentes en ambos lugares. En el océano Índico se observan los síntomas comunes a la ciguatera mezclados con pérdida de coordinación y de equilibrio, alucinaciones, depresión y pesadillas, lo cual hace creer que en estos lugares existe otra clase de CTXs [92].

#### **1.1.6.2. Maitotoxinas (MTXs).**

Las maitotoxinas (MTXs) fueron en un principio consideradas CTXs porque son producidas por la misma especie de dinoflagelados y también se acumulan en peces; actualmente se clasifican aparte debido a sus diferencias estructurales y farmacológicas.

Se trata de una familia de toxinas formada por tres compuestos polietéreos (MTX1, 2 y 3) [35], de gran peso molecular y altamente polares debido a la presencia en su estructura de grupos sulfato e hidroxilo [90, 114], por lo que son solubles en agua.

Los microorganismos productores de las MTXs son los dinoflagelados *Gambierdiscus toxicus*, de hecho parece ser que las diferentes cepas de estos microorganismos producen distintos análogos de este grupo de toxinas [62].

Estas toxinas se detectan principalmente en el intestino de peces herbívoros y probablemente no están implicadas directamente en la ciguatera porque tienen baja potencia oral y poca habilidad para acumularse en la carne de los peces [92].

Se trata de compuestos que actúan como potentes activadores de los canales de calcio de la membrana plasmática en muchos modelos celulares [32] y se encuentran entre los compuestos tóxicos de naturaleza no proteica más potentes [157].

En humanos las MTXs se han asociado a los efectos tóxicos de la ciguatera causada por peces herbívoros, apareciendo fundamentalmente síntomas gastrointestinales sin desórdenes neurológicos [183].

### 1.1.6.3. Brevetoxinas (PbTXs).

Las brevetoxinas (PbTXs) son neurotoxinas cíclicas de naturaleza polietérea. Según el sistema de anillos de la zona central de su esqueleto se distinguen las brevetoxinas de tipo A (las PbTX1, 7 y 10) y las de tipo B (las PbTX2, 3, 5, 6, 8 y 9), siendo las de tipo B las predominantes en la naturaleza [11]. Recientemente se han identificado varios análogos nuevos de las PbTXs, algunos de los cuáles son artefactos que se generan durante su proceso de purificación, cuya toxicología no ha sido estudiada hasta el momento [16].

El organismo productor de estas toxinas es el dinoflagelado *Karenia brevis*. Este dinoflagelado es frágil y puede romperse fácilmente debido a la acción de las olas liberándose las toxinas, que a su vez son arrastradas en las gotas de agua y, dependiendo del viento y de otras condiciones ambientales, llegan a tierra firme en forma de aerosoles [123].

Los moluscos en los que se han encontrado PbTXs son ostras, almejas, berberechos y mejillones [176]. Las intoxicaciones se deben únicamente al consumo de estos alimentos, ya que la mayor parte de los peces, pájaros y mamíferos son susceptibles a estas toxinas y, por ello, no las pueden acumular.

Este grupo de toxinas actúa uniéndose al sitio 5 de los canales de sodio dependientes de voltaje, produciendo su apertura inapropiada e impidiendo su inactivación. Debido a esto existe una gran entrada de sodio al interior celular y se

altera el potencial de membrana. Además la activación de los canales de sodio provoca la liberación de ciertos neurotransmisores, como la acetilcolina, generándose un incremento de la respuesta contráctil del tejido muscular liso y estriado. Este incremento produce sintomatología gastrointestinal y falta de coordinación motora en intoxicaciones alimentarias y broncoconstricción en procesos inhalatorios [10].

Los síntomas tras una exposición oral a estas toxinas incluyen náuseas, vómitos, diarrea, percepción alterada de la temperatura, hipotensión, arritmia, falta de sensibilidad, hormigueo, parestesias en labios, cara y extremidades, broncoconstricción, parálisis y coma. No se han descrito síntomas crónicos ni casos mortales en humanos [55]. Se puede producir una exposición dérmica debido a baños en aguas contaminadas con la toxina (por rotura de los organismos productores), originándose irritación de los ojos y de la mucosa nasal. Además tras la inhalación de estas toxinas pueden aparecer problemas respiratorios (tos no productiva, broncoconstricción, exudados catarrales copiosos) e irritación de ojos, piel y mucosas [8, 23].

#### **1.1.6.4. Iminas cíclicas.**

Las iminas cíclicas son un grupo de toxinas muy diversas que contienen un grupo funcional imino como parte de su estructura cíclica [105]. En muchas de ellas se ha observado que la toxicidad disminuye en gran medida si este grupo imino está reducido o es destruido [66, 151].

Se considera que el grupo de las iminas cíclicas comprende seis subclases de toxinas: gimnodiminas [142], pinnatoxinas [167], prorocentrolidas [67, 163], pteriatoxinas [156], espirolidos [64] y spiro-prorocentrimina [95]. Algunos autores incluyen en este grupo también a las simbioiminas [73, 74].

Estas toxinas son producidas por una gran variedad de microorganismos, pero debido a su reciente descripción su toxicidad y efectos farmacológicos todavía están siendo estudiados.

Por el momento no existen evidencias de intoxicaciones humanas producidas por las iminas cíclicas pero la toxicidad observada en animales de experimentación hace necesario un estudio más profundo de su actividad y distribución [110].

### 1.1.6.5. Policavernósidos y gambierol.

Los policavernósidos son un grupo de moléculas que contienen una estructura macrólida que posee cadenas laterales con un grupo funcional conjugado dieno o trieno y un residuo fucosil-xilosa O-metilado ó O-acetilado. Existe tres tipos de policavernósidos (A, B y C), con diversas toxinas en cada uno de ellos [189, 190], que se han aislado a partir del alga roja *Gracilaria edulis*. Por otra parte, el gambierol presenta una estructura polietérea con una cadena lateral que contiene un grupo trieno y es una toxina aislada a partir del dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* [137].

El mecanismo de acción y las dianas celulares de este grupo de toxinas son desconocidas hasta el momento, debido principalmente a su reciente descripción. Estudios actuales describen un efecto del policavernósido A sobre el potencial de membrana y la entrada de calcio en células de neuroblastoma, aunque no aclaran el motivo por cual esta toxina modifica la actividad neuronal [20]. El gambierol, por su parte, podría afectar a canales de sodio o de potasio dependientes de voltaje [56, 94].

Se han descrito intoxicaciones humanas debidas a los policavernósidos, con desenlaces de muerte en algunos casos. Los síntomas previos son gastrointestinales y neurológicos, incluyendo diarrea, hipersalivación, lagrimeo, espasmos musculares y cianosis [188]. Dado que el gambierol es producido por los mismos dinoflagelados que las CTXs, se cree que esta toxina aislada presenta síntomas similares en humanos [53], si bien hasta el momento no se han documentado casos.

### 1.1.7. Palitoxinas (PITXs).

La palitoxina (PITX) es una de las sustancias no proteicas más tóxicas conocida. Se trata de una molécula grande muy compleja con zonas lipofílicas e hidrofílicas, que debido a su tamaño y a su complejidad química presenta un gran número de isómeros posibles [107]. Entre sus análogos se pueden citar las ostreocinas [168], las ovatatoxinas y las mascarenotoxinas [71].

Se ha propuesto que la PITX y sus análogos son producidas por especies del género *Ostreopsis*, localizadas en principio en zonas tropicales y subtropicales pero que en la actualidad se han encontrado en otras regiones como la costa mediterránea

[27]. Este grupo de toxinas se ha detectado en múltiples especies de peces, cangrejos y mejillones, por lo que puede entrar fácilmente en la cadena alimenticia [51, 57, 118].

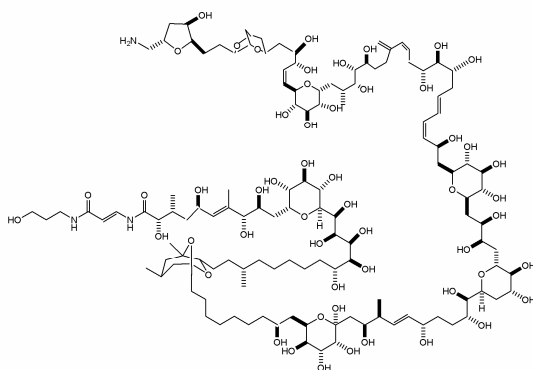


Figura 4. Estructura propuesta para la PITX.

Los estudios relativos al mecanismo de acción de esta toxina parecen indicar que ejerce su actividad sobre la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática y también sobre la bomba  $\text{H}^+/\text{K}^+$  [40]. De esta manera produce cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula y modifica la composición iónica del interior celular, provocando una despolarización y su muerte [112].

Los síntomas en humanos de una intoxicación por PITX incluyen vómitos, diarrea, parestesia de las extremidades y daño muscular. En los casos fatales la muerte está precedida por afecciones respiratorias y cianosis [111]. Estudios recientes describen fiebre y broncoconstricción en individuos expuestos a aerosoles marinos en Italia [54], asociados a mareas de *Ostreopsis ovata* [27].

### 1.1.8. Azaspirácidos (AZAs).

La intoxicación por azaspirácidos (AZAs) se detectó por primera vez en Holanda en 1995, después del consumo de mejillones recogidos en Irlanda. Los cuadros clínicos recordaban a los de las toxinas diarreicas, pero los bajos niveles de

estas toxinas detectados y los síntomas de neurotoxicidad en el bioensayo de ratón indicaron que se trataba de otra toxina [100, 101].

Los AZAs son un grupo de toxinas caracterizadas por una estructura química particular, con un grupo azaspiro con un anillo 2,9-dioxobiciclononano, un residuo trioxodispirocetal unido a un anillo tetrahidrofurano y un ácido carboxílico [141]. Actualmente se han descrito más de 20 análogos pertenecientes a este grupo, con derivados dihidroxi-, carboxi-, carboxi-hidroxi- y dehidro-AZAs, así como ésteres de metilo [130].

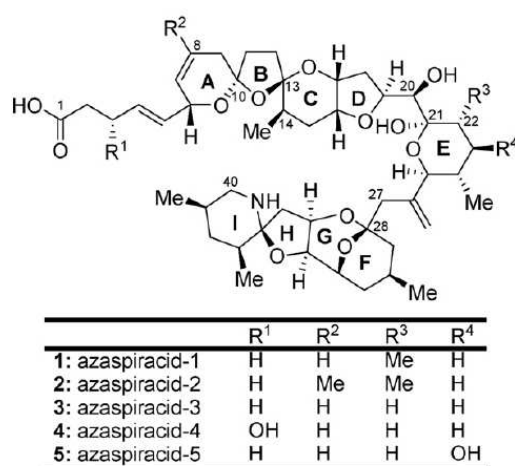


Figura 5. Estructura de algunos AZAs.

En los primeros estudios se detectaron AZAs 1-3 en extractos de células de *Protoperidinium crassipes*, pero las características predatorias de este microorganismo y la falta de ensayos directos sugirieron que tan sólo transformaba un precursor producido por otro dinoflagelado o ingería las toxinas en su alimentación [70]. Recientemente se ha aislado un dinoflagelado productor AZAs, que todavía ha de ser descrito taxonómicamente [79]. Se cree que la mayor parte de los análogos de AZAs se deben a la biotransformación dentro de los moluscos, pero no existen datos suficientes para demostrar esta hipótesis.

Se han encontrado cantidades elevadas de AZAs en mejillones, ostras, vieiras, almejas y berberechos [52] y recientemente se han detectado en crustáceos como los cangrejos [162]. La distribución de estas toxinas en el interior de estos organismos no

está clara, puesto que existen estudios que los asocian predominantemente a la glándula digestiva [61] mientras que otros hablan de su presencia mayoritaria en otros tejidos [69]. Esta última hipótesis no resulta extraña ya que la estructura molecular de los AZAs, con una parte polar y otra apolar, haría posible su movimiento por todo el cuerpo de los moluscos.

El mecanismo de acción de estas toxinas todavía no se ha determinado. Se ha observado un efecto citotóxico del AZA1 en diversas líneas celulares [133, 165, 170, 175], cuya dosis depende del modelo concreto empleado. También se ha demostrado que los distintos análogos tienen un efecto diverso sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [3, 131, 132] y que el AZA1 produce un incremento en el AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Por otro lado, este análogo genera un aumento en los niveles nucleares de la forma activa fosforilada de la quinasa c-Jun-N-terminal [169] y altera la F-actina del citoesqueleto celular. Además se ha detectado un incremento en la transcripción de los genes que codifican enzimas implicados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos en linfocitos humanos tratados con AZAs [166]. A pesar de todos estos datos obtenidos en estudios recientes todavía no se ha formulado una teoría que describa cuál es el mecanismo de acción de estas toxinas.

Los síntomas observados en episodios tóxicos en humanos fueron gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea y calambres en el estómago, similares a los de las toxinas diarreicas, sin haberse registrado por el momento casos mortales.

### **1.1.9. Métodos de detección.**

Se han diseñado muchos métodos para detectar y/o cuantificar las diferentes ficotoxinas marinas. Una parte de ellos se utilizan para aislar e identificar los diferentes compuestos mientras que otros son útiles para cuantificar su concentración en extractos de microalgas y/o de moluscos.

Existen métodos biológicos, químicos, inmunológicos, instrumentales y funcionales, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Uno de los objetivos más importantes de estos métodos es determinar si los productos marinos son adecuados para el consumo humano o si su contenido tóxico es demasiado elevado, de acuerdo



con la legislación aplicable. En general para fines reguladores el método oficial es el bioensayo de ratón, con varios inconvenientes como las consideraciones de tipo ético, la baja especificidad y la obtención de falsos resultados. Sin embargo, la validación de nuevos métodos de detección ha sido difícil debido a diferentes problemas, como la continua identificación de nuevos análogos de ficotoxinas con estructuras diferentes, la falta de estándares y la presencia en muestras naturales de múltiples toxinas que pueden interferir con la tecnología analítica empleada. Debido a todo ello aún continúa la búsqueda de nuevos métodos de detección para las diferentes toxinas que puedan ser validados y aceptados internacionalmente.

#### **1.1.9.1. Bioensayos.**

El bioensayo de ratón es el método tradicional para detectar la mayor parte de las ficotoxinas marinas. Este método consiste en preparar un extracto lipofílico o hidrofílico, en función de la naturaleza química de las toxinas que se desee detectar, a partir del molusco contaminado o de la muestra de dinoflagelados. Este extracto se diluye en el medio apropiado y se inyecta intraperitonealmente en ratones de peso aproximado de 20 g. Finalmente se observan los síntomas que aparecen y el tiempo que el animal tarda en morir, en función del cual se calcula la toxicidad de la muestra comparando este parámetro con los valores obtenidos con estándares de toxinas [42].

Este ensayo presenta diversos inconvenientes, como la necesidad de mantener una colonia de ratones, la variabilidad del resultado en función de la especie de ratón, la cantidad de tiempo consumido para llevar a cabo el ensayo y la gran cantidad de sacrificios animales que implica.

La principal ventaja del bioensayo de ratón es que garantiza la seguridad alimentaria, puesto que puede detectar nuevas toxinas y análogos, por lo que es el método más utilizado para los programas de monitorización y protección de la salud de los consumidores. El objetivo actual es buscar métodos químicos o ensayos *in vitro* que sean equivalentes al bioensayo en lo referente a la protección de la salud pública y que puedan ser validados internacionalmente. Esto se debe fundamentalmente a la directiva 86/609/CEE [39], en la que se establece que el uso

de animales en experimentación debe reducirse y, en los casos en los que sean imprescindibles, ha de ser optimizado y con poco dolor.

Además de los bioensayos de ratón existen otros bioensayos que se aplican para algunas ficotoxinas en concreto.

En el caso de las toxinas DSP se pueden utilizar diversos bioensayos que se basan en la inducción de diarrea a los animales. En el bioensayo con ratones recién nacidos, el extracto de tejidos de molusco se administra intragástricamente a ratones de cuatro o cinco días de edad. Después de cuatro horas se mide el grado de acumulación de fluidos en el tracto gastrointestinal, si éste es elevado se considera que la reacción es positiva [59]. El bioensayo en ratas se basa en la inducción de diarrea a estos animales, para lo que se alimentan con una dieta mezclada con tejido de molusco y se observa la aparición de sintomatología [42, 173]. También se pueden hacer ensayos con el tracto intestinal de conejos o ratas, expresándose los resultados como relaciones entre el volumen de fluido acumulado y la longitud del tracto intestinal. En todos estos casos se detectaría la presencia de cualquier toxina que produjera diarrea [48].

Para las PbTXs se puede utilizar un ensayo en peces, concretamente en la especie *Gambusia affinis*, que sirve fundamentalmente para determinar la potencia del agua contaminada y de extractos de toxina purificados o crudos [9]. Las CTXs, por su parte, se pueden detectar empleando otros bioensayos, por administración oral en pollos, águilas, gatos y larvas y por inyección intratorácica en mosquitos [48].

### 1.1.9.2. Ensayos inmunológicos.

Los ensayos inmunológicos se basan en utilizar anticuerpos que reaccionan con las ficotoxinas y detectar dicha reacción.

El primer paso de un ensayo inmunológico consiste en producir los anticuerpos necesarios. Para ello las toxinas se administran a los animales de experimentación que los van a producir. Éste es un proceso complicado ya que las toxinas son moléculas pequeñas y no tienen capacidad antigénica, por lo que deben unirse a moléculas más grandes antes de ser administradas. Esta reacción previa hace que no todas las toxinas puedan ser utilizadas para producir anticuerpos.

Además para realizar todo el proceso es necesario disponer de cada una de las toxinas puras y en gran cantidad y conseguir anticuerpos que presenten reactividad cruzada frente a toxinas estructuralmente relacionadas para asegurar una buena detección.

Una vez se han obtenido los anticuerpos, la forma de realizar el ensayo con las toxinas y de detectar la unión anticuerpo-toxina puede variar. Los más frecuentes son los enzoinmunoensayos (ELISA), en los que se cuantifica la unión anticuerpo-toxina mediante la reacción de una enzima ligada al anticuerpo con un sustrato específico. Esta reacción puede producir un producto coloreado o fluorescente. De esta forma se han desarrollado kits para detectar casi todas las toxinas marinas [136]. Otra forma de detectar la unión anticuerpo-toxina son los biosensores de afinidad en los que se estudia la unión entre ambas especies fijando una de ellas, generalmente la toxina, a una superficie resonante [47, 93]. Las principales ventajas de estos métodos son su sencillez, sensibilidad, rapidez y capacidad de cuantificación, sin embargo algunos anticuerpos no detectan todas las toxinas del mismo grupo. De entre todos los ELISA para detectar ficotoxinas destaca el desarrollado para las toxinas ASP. Se trata de un método validado internacionalmente y oficial según la AOAC para la detección de este grupo de toxinas [75, 76]. También se ha diseñado un ensayo ELISA para la cuantificación de YTX y sus análogos [17], utilizando anticuerpos policlonales con amplia especificidad por las YTXs. Se trata de una técnica analítica muy sensible y adecuada para programas de monitoreo, ya que permite el análisis de múltiples muestras en muy poco tiempo [135]. El único inconveniente del método es su incapacidad para distinguir entre los distintos análogos de YTX.

### **1.1.9.3. Ensayos funcionales.**

Los métodos funcionales se basan en la unión de las toxinas y algún componente molecular que las reconoce de manera selectiva. Esta interacción se puede cuantificar o produce diversos eventos que se pueden medir y con esos datos se determina la cantidad de toxina en la muestra [134]. Para desarrollar estos métodos es preciso conocer el mecanismo de acción de las toxinas y/o sus dianas celulares. Dentro de este grupo de métodos se distinguen los ensayos de

citotoxicidad con varias líneas celulares y los ensayos que utilizan las dianas celulares de las ficotoxinas aisladas.

Los ensayos de citotoxicidad son ensayos celulares que permiten detectar e incluso a veces cuantificar una respuesta tóxica de células en cultivo expuestas a extractos sospechosos de contener ficotoxinas.

Las preparaciones de células de hipocampo de rata se utilizan para detectar la presencia de STX, PbTX y DA, identificándose cada toxina por sus efectos electrofisiológicos específicos [72]. También se pueden utilizar células de neuroblastoma de ratón para realizar un ensayo con bloqueantes del canal de sodio, detectándose la presencia de toxinas que actúan sobre estos canales en función de la existencia o no de cambios morfológicos en las células [77].

Para las toxinas lipofílicas se pueden utilizar ensayos de citotoxicidad en distintas líneas celulares. Si se miden los cambios morfológicos en cultivos primarios de hepatocitos de rata se pueden diferenciar por un lado OA y DTX1 y por otro PTX1 y YTX; se trata de un proceso lento y laborioso y no funciona muy bien con mezclas de toxinas [7]. Ensayos similares se pueden llevar a cabo con células KB (una línea celular humana derivada de carcinoma epidérmico), fibroblastos,...

Para las YTXs existe un ensayo con células HeLa [99], ya que estas toxinas inducen la muerte celular y la activación de varias isoformas de caspasas. Las células MCF-7 también se pueden emplear para detectar YTX [124], pues esta ficotoxina origina en ellas la acumulación de un fragmento de E-caderina, de manera dosis-dependiente.

Se han desarrollado ensayos de unión a los receptores de glutamato y kainato, en los que el DA de una muestra se cuantifica debido a su competición con el ácido kaínico marcado radiactivamente. Esto se ha llevado a cabo en primer lugar con sinaptosomas de cerebro de rana [171] y posteriormente con receptores de glutamato de cerebro de rata clonados [172]. En este último caso se ha conseguido cuantificar el DA en muestras de agua de mar y de tejido de molusco.

Existen diversos ensayos *in vitro* útiles para la detección de PbTXs, como el ensayo de unión a sinaptosomas de cerebro de rata. Consiste en medir la competición por los receptores entre las brevetoxinas marcadas radiactivamente y las que existan en la muestra a analizar [125]. También se puede hacer un ensayo con

sinaptosomas de cerebro de ratón para detectar CTXs, consiguiendo una mayor sensibilidad que con el bioensayo de ratón [86].

Entre los ensayos que utilizan las dianas celulares aisladas destacan los que se emplean para detectar toxinas DSP y YTXs.

Para detectar las toxinas DSP se pueden emplear distintos métodos basados en la inhibición de las fosfatasas de serina y treonina PP2A. Estos métodos se diferencian por el sustrato que emplean para medir la inhibición de las fosfatasas. Se pueden utilizar sustratos radioactivos [22], colorimétricos [147] o fluorimétricos [174]. El método que más se utiliza es con el sustrato fluorescente, ya que es más preciso, más sensible y produce menos falsos positivos [109]. Con este método se pueden detectar todas las toxinas del grupo DSP, es sencillo y permite el análisis simultáneo de múltiples muestras; por todas estas ventajas está en proceso de validación.

También existen ensayos funcionales basados en la interacción entre las fosfodiesterasas y las YTXs. Uno de ellos [2] cuantifica la actividad de las fosfodiesterasas sobre un derivado fluorescente del AMPc, observándose que al aumentar la concentración de toxina en las muestras se produce un incremento de dicha actividad. El otro método [119, 120] se basa en la detección de la unión entre las YTXs y las fosfodiesterasas utilizando un biosensor de afinidad, y se puede utilizar para cuantificar la toxina presente en una muestra.

Los ensayos funcionales que utilizan células son sensibles y detectan todas las toxinas de cada grupo. Como inconvenientes se pueden citar el tiempo de realización, pues se necesita esperar para observar el efecto citotóxico, y la variabilidad inherente a la obtención y mantenimiento de cultivos celulares, lo cual hace difícil su validación internacional. Frente a ellos los métodos funcionales que emplean moléculas aisladas suelen ser casi instantáneos, pero en general son más difíciles de desarrollar por la necesidad de obtener el receptor o la molécula a la que se unen las ficotoxinas.

#### **1.1.9.4. Ensayos físico-químicos.**

Existen distintos métodos físico-químicos que permiten detectar y cuantificar toxinas marinas en muestras. En todos los casos se trata de métodos que necesitan ser calibrados con estándares puros de cada una de las toxinas que se detecten, por ello son costosos de mantener. Por otro lado, se trata de métodos muy sensibles con una realización compleja, por lo que requieren personal especializado.

Estos métodos suelen consistir en una separación de las toxinas y los distintos componentes de las muestras utilizando cromatografía, seguida de una detección por absorbancia, fluorescencia o espectrometría de masas. La cromatografía puede ser de capa fina, para las toxinas DSP o el DA [59, 126], de gases, para el OA [68], de alta eficacia, utilizada para la mayor parte de las toxinas, o electrocinética micelar, para el OA o las PbTXs [15, 143]. La absorbancia se utiliza para ciertos métodos de detección de toxinas DSP [15] y la fluorescencia se emplea tanto para las DSP como para las PSP. Sin embargo quizás el sistema de detección más versátil es la espectrometría de masas, con el que se han descrito métodos para prácticamente todas las ficotoxinas conocidas.

De todos los métodos físico-químicos existentes sólo hay dos oficiales, validados y que representan una alternativa real al bioensayo de ratón: el que emplea detección por fluorescencia para las toxinas PSP [84] y el que utiliza la detección ultravioleta para las ASP [82, 83].

El mayor problema para la validación de estos métodos es la escasez, y en algunos la inexistencia, de estándares puros que permitan llevar a cabo los estudios intra- e interlaboratorio. El otro problema habitual es la dificultad de diseñar procesos de extracción de las ficotoxinas presentes en las muestras que consigan un alto porcentaje de recuperación y que no arrastren sustancias que interfieran con la tecnología empleada.

#### **1.1.10. Legislación sobre ficotoxinas en la Unión Europea.**

En el Reglamento (CE) 853/2004 [36] se recogen las normas aplicables para la comercialización de alimentos de origen animal, estableciéndose las cantidades

máximas de biotoxinas marinas permitidas (en el cuerpo entero del molusco vivo o en cualquier parte consumible por separado) en los siguientes límites:

- a) 800 µg PSP/kg
- b) 20 mg DA/kg
- c) 160 µg OAeq (OA, DTXs y PTXs)/kg
- d) 1 mg YTXeq/kg
- e) 160 µg AZAeq/kg

En todos estos límites se considera la ficotoxina representativa de cada grupo, por lo que las cantidades de las restantes toxinas legisladas han de convertirse en equivalentes (eq) de la ficotoxina representativa, en función de su toxicidad.

Además el Reglamento (CE) 854/2004 [37] establece que no se pueden comercializar productos de la pesca que contengan biotoxinas tales como la CTX u otras toxinas peligrosas para la salud humana.

El Reglamento (CE) 2074/2005 [38] establece las medidas necesarias para la aplicación de la legislación anterior, fijando los métodos de análisis aplicables para cada una de las ficotoxinas. Así establece el método de análisis biológico para las PSP, el método de HPLC para las ASP y el bioensayo en ratón para las toxinas lipofílicas. Este reglamento determina así mismo la necesidad de tener en cuenta la Directiva 86/609/CEE [39] para todos los métodos biológicos, con la finalidad de reducir el sufrimiento de los animales. Por último, recoge la posibilidad de sustituir los bioensayos por metodologías analíticas, siempre que éstas garanticen la protección de la salud del consumidor y hayan sido previamente validadas a nivel internacional.

En la actualidad existen grupos de expertos de la EFSA (European Food Safety Authority) que están estudiando los límites que aparecen en la legislación mencionada y los métodos de análisis, con la finalidad de sustituir todos los requerimientos que sean insuficientes o innecesarios. A la hora de fijar nuevos límites para la comercialización se necesitan más estudios toxicológicos para responder a cuestiones sobre la biodisponibilidad o la toxicidad relativa de cada una de los análogos pertenecientes a un mismo grupo de toxinas. Recientemente se han descrito proteínas que unen ciertas ficotoxinas en los moluscos [116], por lo que su biodisponibilidad por vía oral puede verse alterada en función de las condiciones de

consumo. Por otra parte, hay toxinas que deberían estar reguladas de manera individual, como las PTXs, ya que su inclusión en el grupo de las toxinas DSP no está de acuerdo con su mecanismo de acción ni con sus efectos toxicológicos. Además muchos de los grupos de toxinas descritos en la presente introducción no están regulados porque hasta el momento sólo aparecían en regiones muy concretas del planeta. Sin embargo, como ya se ha comentado, esta situación está cambiando, por ello es preciso que la legislación regule todas las ficotoxinas peligrosas para la salud humana.

El mayor problema para realizar todos los estudios necesarios y establecer nuevas leyes es la necesidad de material certificado. En muchos casos sólo existe a la venta el estándar de la toxina de referencia de cada grupo, mientras que en otros ninguna de las toxinas está disponible. Por ello es necesario diseñar y optimizar procesos de producción que permitan a la comunidad científica disponer de estándares certificados de cada uno de los análogos de las diferentes ficotoxinas marinas.

## **1.2. Polarización de la fluorescencia (FP).**

### **1.2.1. Fluorescencia.**

La luminiscencia se define como la emisión de luz por una sustancia, siempre que dicha emisión no se deba a que su temperatura sea elevada. Este proceso se produce cuando un electrón regresa al estado electrónico fundamental desde un estado electrónico excitado y pierde el exceso de energía como un fotón.

La luminiscencia se divide formalmente en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, según la naturaleza del estado excitado que la origina [148]. La fluorescencia se produce desde estados excitados singletes, en los que el electrón del estado excitado está apareado, es decir, es de spin contrario al electrón del estado fundamental. El retorno al estado fundamental está permitido (en cuanto al spin) y ocurre rápidamente mediante la emisión de un fotón (velocidades de emisión de fluorescencia típicamente de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ ). La fosforescencia es la emisión de luz desde



estados excitados triplete, en los que el electrón del orbital excitado tiene la misma orientación del spin que el electrón del estado fundamental, de esta forma la transición al estado fundamental está bloqueada y la velocidad de emisión es lenta ( $10^3 - 1 \text{ s}^{-1}$ ). Esta diferencia formal entre ambos procesos no siempre se puede aplicar de forma clara en la práctica.

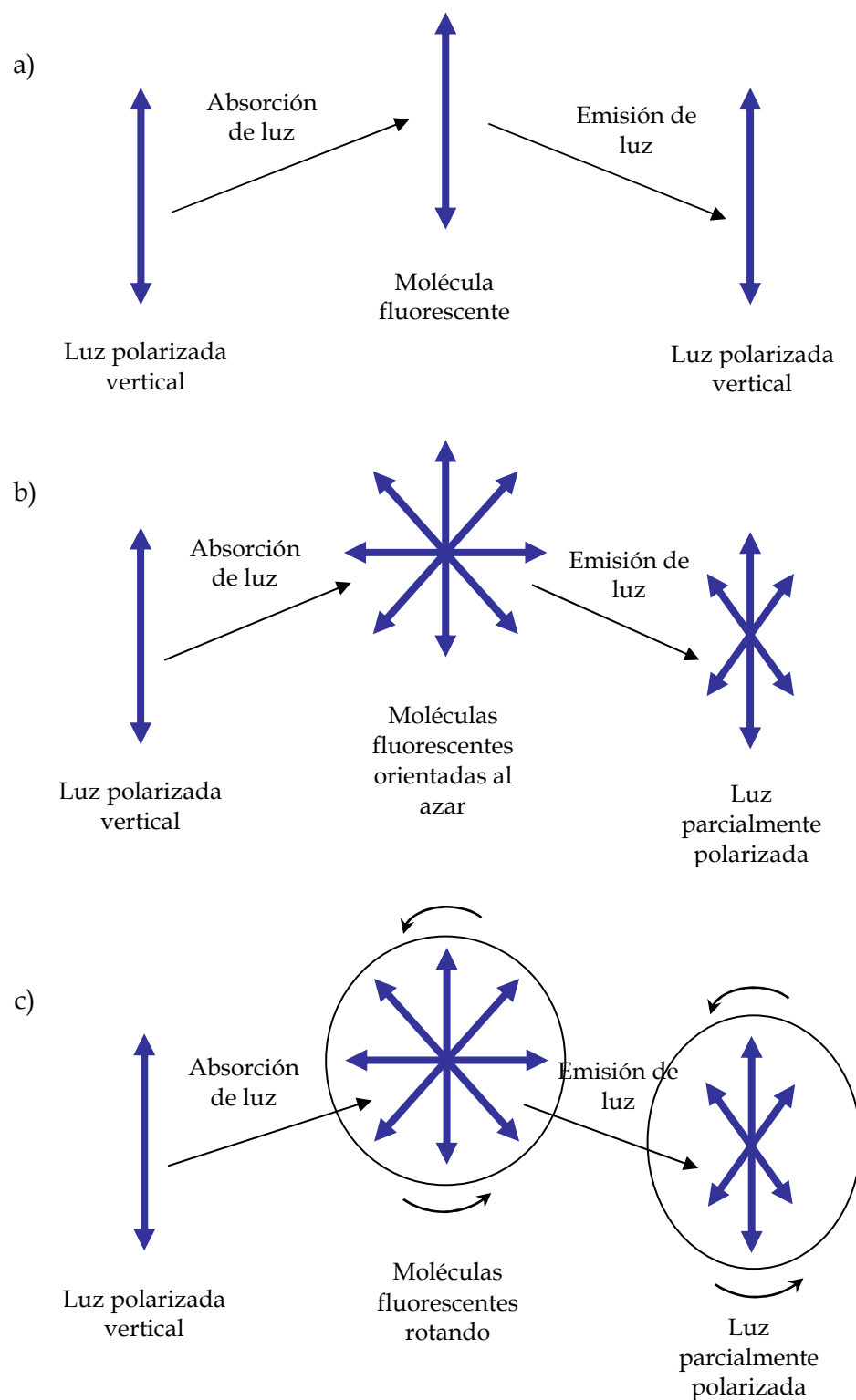
### **1.2.2. FP.**

La teoría de la polarización de la fluorescencia fue descrita por Perrin en 1926 [122]. Se basa en la observación de que si una molécula fluorescente pequeña se excita con luz polarizada en un plano, la luz emitida no va a estar polarizada debido a que esa molécula se mueve mucho en solución durante su tiempo de vida en el estado excitado. Sin embargo si se trata de una molécula de mayor volumen (por ejemplo, si la molécula anterior se une a otra mayor) el movimiento va a ser menor y la luz emitida va a estar polarizada en el mismo plano que la luz de excitación.

En el hipotético caso de que se pudieran tener moléculas inmóviles, de tal forma que todos sus dipolos de excitación fueran paralelos en el plano vertical y fuesen excitadas con luz polarizada en el plano vertical, la luz emitida también estaría totalmente polarizada en el plano vertical (esquema 1a).

Si por el contrario las moléculas inmóviles estuvieran orientadas al azar (de forma que la orientación de sus dipolos de excitación podría ser cualquiera) y fuesen excitadas con luz polarizada en el plano vertical, sucederían varias cosas a la vez. Las moléculas con sus dipolos en el plano vertical actuarían según lo descrito en el caso anterior. Las moléculas con sus dipolos perpendiculares al plano de la luz polarizada no absorberían luz y, por tanto, no emitirían luz. Las moléculas con cualquier otra orientación absorberían luz en distintos grados, dependiendo de lo cerca o lejos que estuviera su orientación del plano vertical. Debido a todo ello la luz emitida no sería totalmente polarizada en el plano vertical sino que incluiría componentes en otras direcciones (esquema 1b).

En la realidad las moléculas en general no están inmovilizadas, sino que rotan, lo cual introduce la variable de que las moléculas absorben luz cuando su



Esquema 1. Influencia de la orientación y el movimiento de las moléculas fluorescentes en la polarización de la luz emitida.

dipolo tiene una determinada dirección y a la hora de emitirla dicha orientación ha variado (esquema 1c).

Con la polarización de la fluorescencia lo que se pretende es medir el grado de polarización de la luz emitida por la muestra y relacionar esa medida con variables que presentan interés, por ejemplo el volumen de las moléculas [181].

### 1.2.3. Medida de la FP.

Para medir la FP la muestra problema se excita con luz verticalmente polarizada (esquema 2) y a continuación se mide la intensidad de la luz emitida que pasa a través de dos polarizadores, uno orientado paralelamente a la dirección de la luz polarizada de excitación (obteniendo así una intensidad que se denomina  $I_{\parallel}$ ) y otro orientado perpendicularmente a dicha dirección (obteniendo un valor llamado  $I_{\perp}$ ).

A partir de estos dos valores la polarización de la muestra se calcula como:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (\text{ecuación 1})$$

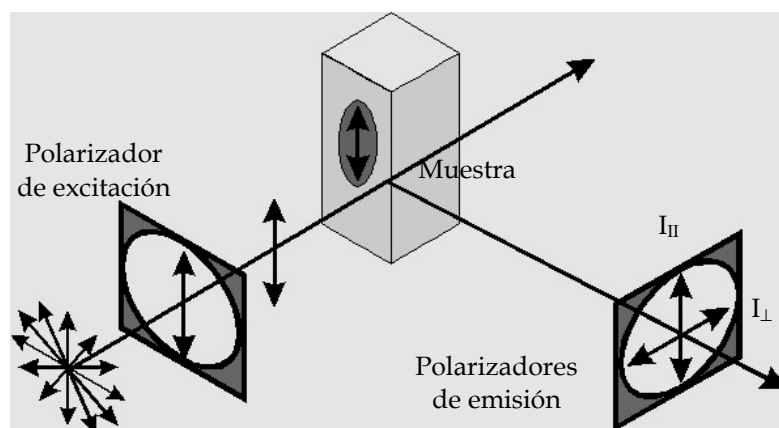
Dado que el cociente obtenido es un número adimensional, se considera que sus unidades son unidades de polarización (P), pudiendo expresarse también como unidades de milipolarización (mP), aplicando la conversión:

$$1 P = 1000 mP \quad (\text{ecuación 2})$$

Las dos condiciones límite de la ecuación 1 son:

- a) La luz emitida está totalmente despolarizada, por lo que los valores de  $I_{\parallel}$  y de  $I_{\perp}$  son iguales y el valor de la polarización es 0.
- b) La luz emitida está totalmente polarizada, por lo que el valor de  $I_{\perp}$  es 0. Aplicando la ecuación 1 se obtiene que la polarización tiene un valor de 1.

En la práctica los valores típicos de P oscilan entre 0.01 y 0.3, es decir, entre 10 y 300 mP.



Esquema 2. Medida de la polarización de la fluorescencia.

### 1.2.4. Ecuación de Perrin.

La importancia del movimiento de la molécula fluorescente en el valor de la polarización aparece definida en la ecuación de Perrin, para el caso de moléculas esféricas:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right) \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde  $P_0$  es la polarización fundamental,  $P$  la polarización medida,  $\tau$  el tiempo de vida en el estado excitado y  $\theta$  el tiempo de correlación rotacional.

El valor de polarización fundamental es el observado en ausencia de procesos que causen despolarización (como el movimiento del cromóforo o la transferencia de energía) y depende del ángulo entre el dipolo de excitación y el dipolo de emisión ( $\alpha$ ), según la fórmula:

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3} \quad (\text{ecuación 4})$$

El tiempo de correlación rotacional ( $\theta$ ) es el tiempo que le lleva a una molécula rotar  $68.5^\circ$ , también se llama tiempo de correlación o tiempo de relajación. Para una esfera se calcula mediante la fórmula:

$$\theta = \frac{\mu V}{RT} \quad (\text{ecuación 5})$$

Siendo  $\mu$  la viscosidad,  $T$  la temperatura absoluta,  $R$  la constante de los gases y  $V$  el volumen de la unidad que está sometida a rotación. Si temperatura y viscosidad son constantes este valor dependerá del volumen molecular, que se ve afectado por alteraciones en el peso de la molécula y también por cambios de conformación [81].

Se puede decir como regla general que la polarización disminuye al aumentar la movilidad. Debido a ello los compuestos fluorescentes en estado libre casi no tienen polarización porque están rotando rápidamente. Cuando se unen a moléculas de pequeño volumen su polarización aumenta algo ya que su movimiento se reduce. Si se unen a moléculas de gran volumen su polarización aumenta mucho más debido a que su movimiento se reduce en mayor medida.

### 1.2.5. Factores que afectan al valor de la polarización.

Existen distintos factores que pueden ocasionar tanto un aumento como una disminución del valor de la polarización de una muestra.

En principio  $P$  es adimensional y, por tanto, independiente de la intensidad de luz de excitación y de la concentración de la molécula fluorescente.

Como causas de despolarización se pueden citar los procesos de absorción, la diferencia de orientación entre los dipolos de excitación y de emisión de la molécula, el movimiento browniano de la molécula, la reabsorción de la luz emitida por una segunda molécula (que luego la emite con una orientación distinta), la luz dispersada y la transferencia de energía.

La polarización aumenta al aumentar el volumen y al aumentar la viscosidad, mientras que disminuye al aumentar el tiempo de vida en el estado excitado.

Como ya se ha dicho si el emisor está rotando rápidamente se producirá un cambio de orientación mientras dura el estado excitado y el valor de la polarización disminuirá.

También hay que considerar la transferencia de energía entre moléculas fluorescentes similares, cuya eficiencia depende de la distancia entre aceptor y dador y, por tanto, de la concentración.

La polarización que se observaría si el absorbente estuviera inmóvil y alejado de cualquier otra molécula se llama polarización intrínseca, lo que en la práctica se consigue si la molécula está en un disolvente de elevada viscosidad a muy baja concentración. A viscosidad y concentración elevadas se detecta el efecto de la transferencia de energía y a viscosidad y concentración bajas el efecto del movimiento molecular.

La luz dispersada puede proceder tanto de la luz incidente como de los fotones emitidos, se puede deber a la turbidez de la muestra y es particularmente importante cuando la luz dispersada alcanza el detector y se trata de soluciones diluidas en las que la intensidad es baja, por lo que la dispersión procedente de los elementos ópticos y de la muestra puede ser significativa. Además los valores de anisotropía pueden ser muy bajos debido a la incorrecta alineación o a la ineficacia de los polarizadores.

La disminución de la polarización también se puede deber a la flexibilidad en la unión al cromóforo y la molécula ("efecto propeller", para el caso de la fluorescencia indirecta), de manera que se distorsionan las relaciones entre la polarización y el volumen.

### **1.2.6. Equipos de medida.**

Los componentes básicos de todo instrumento de medida de polarización de la fluorescencia son [81]: fuente de luz, selector de longitud de onda de excitación, polarizador de excitación, cámara para la muestra, polarizador de emisión, selector de longitud de onda de emisión, detector, sistemas de salida de datos y, a veces, ordenadores de control (esquema 3).

### **1.2.6.1. Fuentes de luz.**

Existen varios tipos de fuentes de luz. En primer lugar las fuentes lineales, que incluyen lámparas espectrales hechas de varios elementos (por ejemplo la lámpara de mercurio) que emiten a ciertas longitudes de onda con elevada intensidad. La presión del gas en estas lámparas tiene un efecto muy importante en la intensidad de la emisión a cada longitud de onda, por lo que se puede variar en función de la aplicación para la que se utilice la lámpara. Sin embargo estas fuentes tienen problemas ya que sólo se pueden usar en instrumentos de filtros y que la emisión que se obtiene de la lámpara a menudo no coincide con la longitud de onda de excitación requerida.

Otro tipo de fuentes de luz son las de emisión continua, que emiten con elevada intensidad en un amplio rango de longitudes de onda. En este grupo se incluyen la lámpara de xenón y la de tungsteno. Entre ellas se prefiere la de xenón debido a su mayor intensidad de emisión y a su amplio rango de longitudes de onda de emisión.

También existe la posibilidad de usar como fuente de luz un láser, que emite a una longitud de onda determinada. Con él se consiguen mejoras en los límites de detección, aunque también aumenta la luz dispersada y se pueden producir efectos locales de calentamiento.

Además en el caso de medidas dependientes del tiempo se usan otro tipo de lámparas que proporcionan pulsos de luz cada cierto número de nanosegundos, que no sirven para las medidas en estado estacionario debido a que su señal es débil.

Existen otros tipos de fuentes de luz que no son lámparas y que se usan en fluorescencia, por ejemplo los diodos emisores de luz (LEDs) y los diodos láser, ambos con una salida que puede ser moderada y regulada.

### **1.2.6.2. Selectores de longitud de onda de excitación.**

Para esta finalidad se emplean distintos dispositivos con los que se consigue aislar una banda dentro del espectro emitido por la fuente de luz, que será la que pase a través de la muestra.

En primer lugar se distinguen los monocromadores. Constan de una estrecha franja de entrada por la que la luz pasa a un área determinada del dispositivo. A continuación una serie de espejos conducen la luz a través del sistema, un elemento de dispersión la separa en sus diferentes longitudes de onda y una franja de salida selecciona la longitud de onda deseada. Lo que se consigue con todo ello es que la intensidad de radiación a la salida sea máxima a una longitud de onda determinada y llegue a un valor de prácticamente cero si las longitudes de onda son mayores o menores (aunque sólo sean algunos nanómetros de diferencia). El elemento de dispersión empleado puede ser un prisma o una reja de difracción.

El dispositivo más simple es el filtro, que consiste en una pieza de cristal coloreada o de gelatina coloreada metida entre placas de cristal. Este sistema permite el paso de una longitud de onda con un rango determinado. Debido a ello en aparatos que sólo emplean filtros la única forma de aportar versatilidad es utilizar varios de ellos.

### **1.2.6.3. Polarizadores de excitación y de emisión.**

Los polarizadores son unos instrumentos que transmiten la luz cuyo vector eléctrico está alineado con el eje de polarización y bloquean aquella cuyo vector forme un ángulo de  $90^\circ$  con dicho eje. Esto se debe a que están fabricados con materiales formados por partículas alargadas, varillas o placas alineadas paralelamente unas a otras de forma regular, debido a lo que transmiten un plano de luz polarizada y absorben el perpendicular. Además para una adecuada medida de la polarización se requiere que los polarizadores estén correctamente colocados en las posiciones horizontal y vertical, ya que en caso contrario la relación de intensidades que se calcula no sería real.

### **1.2.6.4. Cámara para la muestra.**

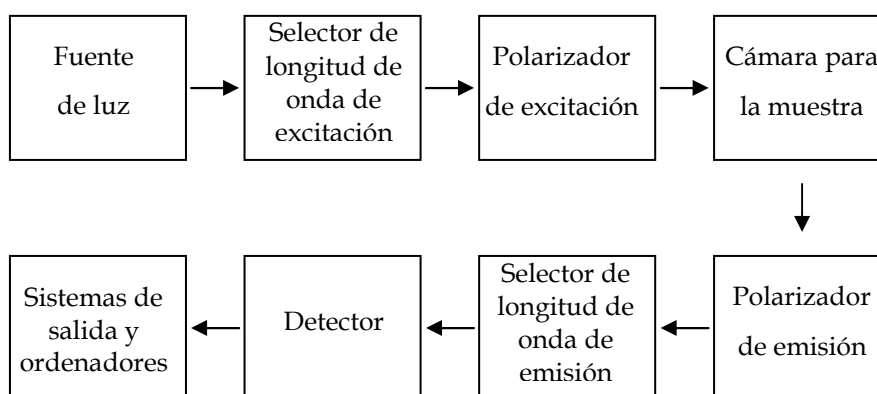
La cámara para la muestra puede estar fabricada con diversos materiales: cuarzo, cristal o algunos plásticos (poliestireno, polietileno,...), según cuales sean los solventes que se utilicen y las longitudes de onda a las que se mida. A veces los



dispositivos empleados permiten fijar la temperatura en un valor concreto o variarla de forma determinada a lo largo del tiempo e incluso mantener la muestra en movimiento con ayuda de microagitadores.

### 1.2.6.5. Selectores de longitud de onda de excitación.

Como selectores de longitud de onda de emisión se utilizan los mismos dispositivos que para seleccionar la longitud de onda de excitación. Con ellos se aísla una estrecha banda del espectro emitido por la muestra, que será la que se reciba en los detectores.



Esquema 3. Esquema de los componentes básicos de un equipo de medida de polarización de la fluorescencia.

### 1.2.6.6. Detectores.

Su finalidad es convertir la radiación que llega a ellos procedente de la muestra en una señal eléctrica que luego pueda ser procesada y sirva para obtener resultados.

El detector más simple es la fotocélula, que es una pieza de metal cubierta con un material sensible a la luz. La radiación que llega a este material aporta suficiente energía para mover los electrones de la pieza de metal y generar una corriente eléctrica. Este sistema tiene ventajas, es barato y robusto, e inconvenientes, principalmente un rango limitado de longitudes de onda y una baja sensibilidad.

Otra posibilidad son los fototubos, consistentes en una cubierta de cristal o sílice que se lleva casi al vacío, dentro de la cual hay un cátodo y un ánodo. Al entrar la luz en el fototubo se va a producir una corriente eléctrica que se hace pasar por un amplificador antes de ser leída. Es mucho más sensible que las fotocélulas pero requiere una fuente externa, que mantenga la diferencia de voltaje entre los electrodos, y un amplificador externo.

El dispositivo más utilizado en la actualidad son los fotomultiplicadores (PMTs), que se parecen a los fototubos pero son mucho más sensibles y permiten amplios rangos de longitudes de onda. La base física es la misma que la de los fototubos, pero tienen una gran amplificación interna de la señal generada. La luz que pasa a través de la cubierta de sílice del fotomultiplicador choca con un electrodo llamado fotocátodo que emite electrones. Éstos son atraídos a un segundo electrodo (el primer dinodo) que es mantenido a un voltaje más alto que el cátodo. Cada electrón que alcanza el primer dinodo provoca la emisión de dos o más electrones que llegan al segundo dinodo que está a un potencial todavía más alto. Este proceso sigue a lo largo de la cadena de dinodos de manera que al final (con nueve o más dinodos) se obtendrán millones de electrones a partir de un único fotón que llegue a la cubierta.

Además actualmente está aumentando el uso de CCDs (charge-coupled devices) en fluorescencia. Se trata de detectores de imagen de gran sensibilidad que contienen aproximadamente 500000 pixels, cada uno de los cuales actúa como un detector que acumula carga en función de la exposición total a la luz, que sirve para obtener una imagen en dos dimensiones. Estos sistemas se usan ampliamente en microscopia de fluorescencia y se espera que en el futuro se extienda cada vez más a la espectroscopia de fluorescencia.

#### **1.2.6.7. Sistemas de salida y ordenadores.**

Sirven para convertir las señales analógicas que salen del detector en datos que pueden ser usados para comparar ensayos. Incluyen tanto circuitos electrónicos que convierten los datos como unidades para hacerlos visibles. Muchas veces se

utilizan ordenadores que, además de hacer visibles los datos, los almacenan y facilitan su uso y tratamiento.

### **1.2.7. Moléculas fluorescentes.**

Existe una gran cantidad de compuestos fluorescentes, cada uno con sus correspondientes propiedades y adecuados, por ello, para algunas de las técnicas utilizadas en fluorescencia (por ejemplo para medir cambios en el pH se utiliza una molécula sensible a cambios en la concentración de protones).

Estos compuestos se pueden dividir en dos grupos: intrínsecos y extrínsecos, siendo los intrínsecos los que existen de forma natural y los extrínsecos los añadidos a cualquier muestra que no tiene las características fluorescentes deseadas.

En el caso de las proteínas existen tres aminoácidos que aportan fluorescencia intrínseca: triptófano, tirosina y fenilalanina. En la práctica la molécula más estudiada es la del triptófano, ya que el rendimiento cuántico de la fenilalanina es demasiado bajo y la fluorescencia de la tirosina suele ser demasiado débil debido a la extinción. El estudio de la fluorescencia del triptófano resulta adecuado para conocer las variaciones en la conformación espacial de las proteínas, ya que ambas características dependen en gran medida de las condiciones del medio.

Muchos de los cofactores de las enzimas son fluorescentes, como el nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), el flavina mononucleótido y el flavina adenina dinucleótido en sus formas oxidadas (FMN y FAD respectivamente) y el fosfato de piridoxal.

La fluorescencia extrínseca se debe a compuestos fluorescentes introducidos por enlace químico o por simple acoplamiento. El compuesto fluorescente debe estar fuertemente enlazado en un solo lugar de la molécula, su fluorescencia debe ser sensible a las condiciones ambientales y no debe afectar a las características de las macromoléculas que se están estudiando. Algunos de los compuestos fluorescentes que se utilizan son el cloruro de dansilo, la rodamina, la fluoresceína, los isotiocianatos de rodamina y fluoresceína, varias acridinas (proflavina, acriflavina, naranja de acridina) y el bromuro de etidio, siendo los dos últimos muy empleados

con los ácidos nucleicos y los restantes más utilizados con las proteínas. Todas las moléculas descritas hasta ahora son moléculas orgánicas, pero también cabe citar otros dos tipos de moléculas fluorescentes interesantes para ciertos ensayos: los quelatos de lantánidos (en general de europio, terbio, disprosio y samario) y los complejos de ligando y metales de transición (típicamente complejos de rutenio, renio u osmio).

Para realizar medidas de FP se puede usar cualquier molécula fluorescente, salvo ciertas excepciones como los quelatos de lantánidos.

### **1.2.8. Modos de medida de FP.**

Hay dos formatos posibles para la medida de la polarización de la fluorescencia: el L y el T [180]. En el formato L hay un canal de excitación y un canal de emisión. Debido a ello para obtener la polarización hay que poner en el canal de emisión dos polarizadores distintos y medir  $I_{||}$  e  $I_{\perp}$  de forma sucesiva. Se necesita el uso de un factor de corrección para tener en cuenta la polarización parcial que puede ocurrir en el selector de longitud de onda y la dependencia de su eficacia de transmisión con el ángulo del polarizador. En el formato T hay un canal de excitación y dos canales de emisión, uno para el componente vertical y otro para el horizontal. En este caso se necesita un factor de corrección para tener en cuenta las distintas sensibilidades y situaciones de los polarizadores de los dos canales de emisión.

### **1.2.9. Ventajas y limitaciones de la FP.**

Una de las ventajas más importantes de esta técnica es la facilidad a la hora de preparar ensayos. Para ello sólo hay que contar con un compuesto fluorescente, ya sea natural o debido a la unión de un compuesto extrínseco a otra molécula, que no necesita estar en un soporte sólido sino que puede permanecer en solución, permitiendo análisis en rangos tan reducidos como el picomolar. Por otro lado, no es preciso separar los componentes por lavado previamente a la medida, lo cual es

importante porque además del tiempo requerido para ello, la reacción puede ser modificada durante dicho proceso.

Una vez que se hace una medida de polarización la muestra no queda alterada, sino que puede ser tratada con algún agente y analizada de nuevo. Se trata siempre de medidas en “tiempo real”, prácticamente automáticas, por lo que permiten la realización de ensayos cinéticos, además de los estudios de equilibrio.

Esta técnica también presenta muchas ventajas en el área de instrumentación, siendo relativamente insensible a cambios instrumentales como ganancias, cambios de lámparas,... Además con los nuevos equipos es posible llevar a cabo tratamientos de elevada cantidad de muestras a la vez (en placas con múltiples pocillos: 96, 384, 1536,...) y que el ensayo sea mecanizable.

Los ensayos de polarización se aplican principalmente al estudio de las interacciones moleculares y dan una medida de la relación entre el trazador libre y el trazador unido, por ejemplo: ensayos con receptores y ligandos, interacciones proteína-péptido, proteína-ADN, inmunoensayos competitivos,... También se usan para obtener información sobre el tamaño, la forma y la orientación de moléculas (principalmente proteínas), la rigidez de los medios moleculares (concretamente es muy importante el estudio de la movilidad de los lípidos de la membrana), la desnaturalización de proteínas,...

Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones. Hay que tener cuidado, en primer lugar, con movimientos locales en la unión del ligando a la molécula que pueden interferir con las medidas realizadas y ser interpretados erróneamente, ya que induciría a pensar que el ligando no se ha unido y, por ello, sigue rotando rápidamente.

También hay que adecuar la molécula fluorescente seleccionada al cambio que se desea observar en el volumen molecular, ya que el valor de la polarización aumenta al aumentar el volumen, pero a continuación alcanza un nivel constante que depende de las características del fluoróforo. Además hay que considerar que a veces se necesitan grandes cambios en el volumen para obtener un cambio significativo en el valor de la polarización.

Si bien todas las relaciones entre polarización y volumen molecular se traducen en relaciones entre polarización y masa molecular, éstas no siempre son

aplicables pues a veces al aumentar la masa no aumenta el volumen, ya que se producen cambios conformacionales.

## **1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).**

### **1.3.1. Cromatografía.**

La cromatografía es una técnica analítica de separación en la que una muestra compleja se desplaza en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, a través de una fase estacionaria, fijada a una columna o a una superficie sólida. Es esencial escoger ambas fases de tal modo que los componentes de la muestra se distribuyan de distinto modo entre ellas. Las moléculas fuertemente retenidas por la fase estacionaria se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que las que se unen débilmente a la fase estacionaria serán arrastradas con rapidez por la fase móvil. Debido a esta distinta movilidad los componentes de una muestra se van a separar en bandas o zonas discretas que podrán ser analizadas cualitativa o cuantitativamente.

Existen varios métodos cromatográficos que se pueden clasificar de distintas formas. Una clasificación se basa en la forma de contacto entre la fase estacionaria y la fase móvil, distinguiéndose la cromatografía en columna y la cromatografía en plano. En la primera de ellas un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil ejerciendo una presión, mientras que en la segunda la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o un papel y la fase móvil se desplaza por capilaridad o por gravedad. La otra clasificación más frecuente se basa en el tipo de fase móvil y de fase estacionaria, que determinan los equilibrios de los solutos entre ambas fases, distinguiéndose la cromatografía de líquidos, la de gases y la de fluidos supercríticos [148].

El resultado obtenido con cualquier técnica cromatográfica es un gráfico que recibe el nombre de cromatograma. En él se representa una señal dependiente de las moléculas presentes en la muestra frente al tiempo transcurrido desde que se haya añadido la fase móvil. Este cromatograma presenta picos u oscilaciones con los que

es posible realizar análisis cualitativos y cuantitativos. Los primeros se basan en la posición de los picos en el eje del tiempo, identificando los distintos componentes de la muestra, mientras que los segundos se basan en el área bajo los picos, determinando la cantidad presente de cada componente. En ambos casos es esencial determinar el tiempo de retención de cada molécula, que se define como el tiempo transcurrido desde que la muestra se inyecta en el sistema cromatográfico hasta que el pico de analito alcanza el detector.

### **1.3.2. HPLC.**

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad debido a su sensibilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, especies organometálicos y sustancias inorgánicas).

En principio se utilizó una alta presión para incrementar la velocidad lineal y reducir la difusión de los compuestos en el interior de las columnas empaquetadas, mejorando así la resolución de la cromatografía. Se emplearon para ello bombas capaces de generar hasta 500 psi, y la técnica de cromatografía líquida recibió el nombre de high-pressure liquid chromatography (cromatografía líquida de alta presión). En la década de los 70 la tecnología empleada experimentó grandes avances, con bombas capaces de generar hasta 6000 psi, mejores inyectores y detectores y columnas con partículas más pequeñas, en ese momento se mantuvo el acrónimo de HPLC pero el nombre pasó a ser high-performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia). En la actualidad para incrementar la resolución, la velocidad y la sensibilidad en la cromatografía líquida se han introducido columnas con partículas más pequeñas e instrumentos adecuados para bombear la fase móvil a presiones del orden de 15000 psi, o incluso 100000 psi, recibiendo esta tecnología el nombre de UPLC, ultra-performance liquid chromatography (cromatografía líquida de ultra eficacia) [182].

### **1.3.3. Componentes de un sistema de HPLC.**

#### **1.3.3.1. Sistemas de bombeo.**

Un sistema de bombeo de HPLC debe ser capaz de generar elevadas presiones, producir un flujo libre de pulsaciones, conseguir un amplio intervalo de caudales con elevada reproducibilidad y estar dotado de componentes resistentes a la corrosión.

Las bombas empleadas pueden ser de distintos tipos, siendo las más comunes las recíprocas, las de desplazamiento y las neumáticas [148].

Las bombas recíprocas consisten en una cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. El flujo de disolvente hacia dentro y hacia fuera del sistema es controlado por dos válvulas de cierre de bola, que se abren y se cierran alternativamente. Con este diseño el disolvente estaría en contacto directo con el pistón. Otra posibilidad es comunicar al disolvente la presión a través de un diafragma flexible, que se bombea a su vez hidráulicamente por un pistón de vaivén. Una desventaja de las bombas recíprocas sería el flujo pulsado que producen; este problema se puede solucionar utilizando bombas con dos pistones que al trabajar alternativamente consiguen un flujo constante. Las ventajas de las bombas recíprocas son múltiples: su pequeño volumen interno, sus altas presiones de salida, su fácil adaptación a los gradientes y sus caudales constantes, prácticamente independientes de la columna y de la viscosidad del disolvente.

Las bombas de desplazamiento consisten en grandes cámaras similares a jeringas, dotadas de un émbolo que se activa por un mecanismo de tornillo accionado mediante un motor paso a paso. El flujo así generado está libre de pulsaciones y es independiente de la viscosidad del disolvente y de la columna. Sus desventajas son la limitada capacidad de disolvente y la dificultad de cambio entre disolventes.

Las bombas neumáticas más sencillas constan de un recipiente plegable para la fase móvil, que se presuriza mediante gas comprimido. Se trata de bombas baratas



y libres de impulsos, pero con capacidad limitada y presión de salida fija. Además el caudal depende de la viscosidad del disolvente y de la presión en la columna y no se pueden utilizar para obtener gradientes.

Para que los sistemas de bombeo funcionen correctamente es esencial que las fases móviles no contengan gases disueltos ni partículas en suspensión. Para ello se suelen utilizar desgasificadores, que pueden consistir en sistemas de bombeo por vacío, sistemas de destilación, dispositivos para agitar los disolventes o sistemas de purga que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante burbujas finas de un gas inerte de baja solubilidad. A veces los equipos de HPLC también contienen dispositivos para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes. Desgasificadores y filtros no siempre forman parte del sistema de HPLC; ya que los disolventes pueden filtrarse y los gases disueltos pueden eliminarse, por ejemplo utilizando ultrasonidos, antes de ser introducidos en el sistema de HPLC.

### **1.3.3.2. Sistemas de inyección de la muestra.**

Los sistemas de inyección hacen posible la introducción de la muestra sin despresurizar el sistema y sin sobrecargar la columna. Habitualmente la muestra se suele introducir mediante bucles de muestra, dispositivos integrados en el equipo e intercambiables que permiten variar el volumen de muestra inyectado. Por otro lado, la mayor parte de los sistemas de HPLC utilizan inyectoros automáticos, si bien suele ser también posible la introducción de la muestra de manera manual. Los sistemas de inyección son un componente fundamental del HPLC, ya que un factor limitante en la precisión de una separación cromatográfica es la reproducibilidad con la que se pueda introducir la muestra en la columna.

### **1.3.3.3. Detectores.**

Un detector es un instrumento con la capacidad de percibir la presencia de un compuesto y enviar la señal eléctrica correspondiente a un ordenador de registro. Las características ideales de un detector son múltiples, se pueden citar la alta

sensibilidad, la respuesta lineal para los diferentes analitos, la reproducibilidad y el tiempo de respuesta corto. Además resulta interesante que el detector presente una respuesta semejante para todos los analitos, o alternativamente una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.

Según las características y concentraciones de los compuestos implicados en la separación cromatográfica se puede escoger el detector más adecuado para cada aplicación. De manera general se distinguen dos tipos básicos de detectores. El primero de ellos engloba los que están basados en la medida de una propiedad de la disolución, que se verá afectada por la presencia en la misma de las moléculas que se van a separar, destacando los detectores que miden el índice de refracción, la constante dieléctrica y la densidad. El segundo tipo está formado por aquellos que miden una propiedad de los compuestos que se desean separar, destacando los de absorbancia, los de fluorescencia y los de espectrometría de masas.

Una práctica común en HPLC es el uso de dos detectores, colocados en serie o en paralelo en función de las características de la muestra, fundamentalmente de la concentración de las moléculas de interés.

#### **1.3.3.4. Columnas.**

Las columnas son un elemento esencial para que transcurra la separación cromatográfica. La fase estacionaria está contenida en un tubo con terminaciones, aislada por ambos lados, que debe ser capaz de contener la presión generada en su interior tanto durante su fabricación como durante su uso. Las columnas deben proporcionar un camino controlado y adecuado para la entrada y la salida de la muestra, sin fugas, con el mínimo volumen posible y sin volúmenes muertos. Además deben ser químicamente inertes respecto al sistema de separación (muestra, fase móvil y fase estacionaria).

La mayor parte de las columnas están construidas en acero inoxidable para conseguir la mayor resistencia posible a la presión. El PEEK (un plástico de última generación) y el cristal, aunque son menos resistentes a la presión, pueden usarse cuando se requieren superficies inertes para aplicaciones especiales de tipo químico

o biológico. La columna de cristal ofrece la ventaja de poder detectar visualmente la separación que tiene lugar en su interior.

Las dimensiones de una columna se deben escoger en función de la escala de separación cromatográfica que se va a realizar, analítica o preparativa. En las separaciones analíticas se utilizan columnas con pequeño diámetro interno, con la única finalidad de cuantificar e identificar los componentes presentes en una mezcla. Sin embargo, en la cromatografía preparativa se emplean columnas con diámetros internos mayores, para purificar y coleccionar compuestos puros a partir de una mezcla compleja, usando para ello un colector de fracciones situado a continuación del detector. Por otro lado, la longitud de la columna suele estar determinada por el grado de separación entre componentes que se desee obtener.

Otro parámetro que diferencia las columnas cromatográficas entre sí es su relleno [115]. Existen dos tipos básicos de relleno: pelicular y de partícula porosa. El primero consiste en bolas de vidrio o de polímero, no porosas y esféricas, con diámetro de 30 a 40 micras. En su superficie se deposita una capa delgada y porosa, que suele ser de sílice, de alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o de una resina de intercambio iónico. El recubrimiento también puede ser una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción, una capa superficial orgánica,... Los rellenos de partícula porosa están formados por micropartículas porosas de pequeño diámetro y con la menor dispersión posible. Las partículas en este caso también son de sílice, alúmina, resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico. Las partículas de sílice se preparan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores en unas condiciones tales que se forman partículas mayores de diámetros muy uniformes. Las partículas resultantes a menudo se recubren con partículas orgánicas unidas física o químicamente a la superficie.

La resolución cromatográfica es el grado de separación conseguido para dos componentes de una mezcla. Hay dos factores principales que determinan el poder de separación o resolución que se puede alcanzar en una columna de HPLC: el poder de separación mecánico, debido a la longitud de la columna, el tamaño de partícula y la uniformidad del empaquetamiento, y el poder de separación químico, debido a la competición físico-química de los compuestos de la muestra entre la fase

estacionaria y la fase móvil. La eficiencia mide el poder de separación mecánico y la selectividad mide el poder de separación químico [182].

El poder de separación mecánico en una columna estable y uniformemente empaquetada está determinado por su longitud y su tamaño de partícula y a menudo se mide y se compara por el número de platos (N). Los tamaños de partícula más pequeños producen mayor eficiencia y mayor presión. Si se mantiene constante el tamaño de partícula se conseguirá mayor separación mecánica cuanto mayor sea la longitud de la columna. Las desventajas correspondientes son mayores tiempos de pinchazo, mayor consumo de disolventes y mayor presión.

El poder de separación químico vendrá determinado por la combinación de fase móvil y fase estacionaria. Para conseguir una buena separación entre analitos lo mejor es optimizar esta variable y escoger el modo de cromatografía o mecanismo de retención adecuado.

A menudo para aumentar la vida útil de una columna se utiliza una precolumna colocada delante de la columna, que sirve para eliminar la materia en suspensión y los componentes de la muestra que se unen de forma irreversible a la fase estacionaria. La composición del relleno de precolumna y columna ha de ser similar, mientras que el tamaño de partícula puede ser mayor en la precolumna.

Un sistema de HPLC consta en ciertos casos de un horno para mantener la columna a la temperatura requerida para que tenga lugar la separación cromatográfica. Estos hornos pueden ser capaces de controlar la temperatura en décimas de grado, desde temperatura ambiente hasta 100 ó 150°C.

### **1.3.4. Modos de separación en HPLC.**

Hay tres características principales que se pueden usar para conseguir una separación de HPLC: la polaridad, la carga eléctrica y el tamaño molecular [182].

#### **1.3.4.1. Separaciones basadas en la polaridad.**

En este tipo de separaciones el grado de retención de una molécula concreta estará determinado por los grupos funcionales principales que contenga y por su

disposición espacial, en función de lo cual habrá moléculas altamente polares y altamente apolares. La regla básica que rige estas separaciones es que moléculas con polaridad cromatográfica similar tienden a atraerse, por ello habría que seleccionar una fase móvil y una fase estacionaria de diferentes polaridades. Los disolventes que forman parte generalmente de las fases móviles se pueden clasificar en series eluotrópicas, en función de su polaridad cromatográfica relativa, yendo desde el más polar, el agua, al menos polar, el hexano, pasando por metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Se podría hacer una clasificación similar para las fases estacionarias. La sílica tiene una superficie hidrofílica que contiene grupos funcionales silanol. La polaridad de dicha superficie puede ser modificada selectivamente uniéndole químicamente grupos funcionales no polares: de cianopropilsilil- (CN), n-octilsilil- (C8) y n-octadecilsilil- (C18, ODS).

Existen distintos tipos de separaciones basadas en la polaridad, entre ellas la cromatografía en fase normal y en fase reversa, la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, hydrophilic-interaction chromatography) y la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, hydrophobic-interaction chromatography).

En la cromatografía en fase normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar. Un ejemplo sería el uso de la sílica como fase estacionaria y del hexano como fase móvil. De esta manera los compuestos no polares salen antes de la columna, mientras que los polares quedan retenidos.

En la cromatografía en fase reversa se usa una fase estacionaria no polar, como la C18, y una fase móvil polar, como una disolución acuosa. De esta forma los compuestos no polares quedarán retenidos en la columna, mientras que los polares saldrán rápidamente. Este tipo de cromatografía es el más utilizado hoy en día, debido a su mayor reproducibilidad y a sus amplias aplicaciones.

La cromatografía de interacción hidrofílica es una variante de la cromatografía en fase normal. En esta última la fase móvil es totalmente orgánica, con trazas de agua en ella y en los poros de las partículas de fase estacionaria polares. Debido a esto los analitos polares se unen fuertemente a la fase estacionaria polar y pueden no ser eluidos. Si se añade un pequeño porcentaje de agua (igual o menor al 20%) a la fase orgánica polar se pueden separar y eluir compuestos polares que serían fuertemente retenidos en la cromatografía en fase normal (y débilmente

retenidos en la cromatografía en fase reversa). El agua presente, al ser un compuesto muy polar, compite con los analitos polares por la fase estacionaria y éstos se eluirán en función de su hidrofiliidad.

La cromatografía de interacción hidrofóbica es un tipo de cromatografía en fase reversa adecuado para separar biomoléculas de gran tamaño, como las proteínas, que no pueden desnaturalizarse por lo que no deben entrar en contacto con solventes orgánicos. Se trata de grandes moléculas que presentan interacción hidrofóbica con fases estacionarias moderadamente hidrofóbicas, como la C4. Inicialmente se utilizan grandes concentraciones de sales en agua que originan que las proteínas sean retenidas en el empaquetamiento. Con un gradiente decreciente en la concentración de sal se consigue una elución de las biomoléculas en función de su hidrofobicidad.

#### **1.3.4.2. Separaciones basadas en la carga eléctrica.**

En este tipo de separaciones la regla básica aplicable es la de que las moléculas con carga eléctrica de igual signo se repelen mientras que las moléculas con carga eléctrica de distinto signo se atraen entre sí. Las fases estacionarias empleadas se caracterizan por el tipo de grupos funcionales ácidos o básicos de sus superficies y por los tipos de iones que pueden atraer y retener. El intercambio catiónico se utiliza para retener y separar iones cargados positivamente en una superficie negativa. Por el contrario, el intercambio aniónico se usa para retener y separar iones cargados negativamente en una superficie positiva.

#### **1.3.4.3. Separaciones basadas en el tamaño molecular.**

En este tipo de separaciones se emplean fases estacionarias sintetizadas con una distribución de poros en un rango amplio, que permite a los analitos entrar o ser excluidos del volumen de poro del empaquetamiento. Debido a esta distribución las moléculas más pequeñas penetran en un mayor número de poros mientras que las más grandes sólo pasan entre las partículas, siendo eluidas con rapidez. Las fases móviles se eligen en función de su idoneidad para disolver los analitos de interés y

de su capacidad para prevenir cualquier tipo de interacción, debido a la polaridad o a la carga, entre dichos analitos y las fases estacionarias.

### **1.3.5. Modos de elución en HPLC.**

En HPLC existen dos modos básicos de elución: isocrático y gradiente. En el primero de ellos la composición de la fase móvil, que puede ser un disolvente puro o una mezcla, permanece constante a lo largo de cada pinchazo. Sin embargo, en el modo gradiente la composición de la fase móvil cambia durante la separación, de manera continua o escalonadamente. El modo gradiente se suele utilizar para muestras que contienen compuestos con un amplio rango de polaridad cromatográfica, aumentando de manera significativa la eficacia de separación. En este caso la fuerza de elución de la fase móvil se incrementa a medida que la separación tiene lugar, con la finalidad de conseguir que los componentes de la muestra más fuertemente retenidos sean eluidos. El mezclador de las fases móviles puede estar situado después de las bombas, con lo que el gradiente se crea en alta presión, o antes de una sola bomba común, con lo que el gradiente se crea en baja presión y una válvula de mezcla selecciona la proporción de cada uno de los disolventes empleados.

## **1.4. Espectrometría de masas.**

### **1.4.1. Espectrometría de masas.**

La espectrometría de masas es una técnica analítica que sirve tanto para proporcionar información sobre la estructura de una determinada molécula como para conocer la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla compleja de moléculas. Esta técnica fue descrita en los años cuarenta para el análisis cuantitativo de mezclas de hidrocarburos producidas por fraccionamientos catalíticos en la industria del petróleo, presentando en la actualidad innumerables aplicaciones en

múltiples campos. Una de las más importantes es la identificación de compuestos puros, con la obtención de su peso y su fórmula moleculares.

De forma resumida y simple un espectrómetro de masas se puede describir como un equipo en el que se bombardean las moléculas de una mezcla con un haz de electrones, produciéndose la pérdida de un electrón por parte de ellas y formándose un ión molecular, que es detectado por el equipo de análisis. Empleando determinadas condiciones el ión molecular se fragmenta para dar lugar a iones de masas más bajas, que pueden llegar incluso a presentar más intensidad que el ión molecular [148]. Los espectros de masas se originan al representar la intensidad de los iones que se detectan frente a su relación masa/carga,  $m/z$ . En un espectrómetro de masas se puede realizar un barrido por todos los iones generados por la muestra que se introduce en el equipo (mass scan), o bien monitorizar uno o más iones de interés (SIR, single ion recording).

#### **1.4.2. Componentes de un espectrómetro de masas.**

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, pero todos constan de los siguientes componentes principales: sistema de entrada de la muestra, fuente de iones, analizador de masas y detector. En la mayor parte de los equipos comerciales el sistema de entrada de la muestra y la fuente de iones están combinados, formando un único componente [4].

Una característica común a todos los espectrómetros de masas es la presencia de un sistema de vacío adecuado que logre mantener la presión en valores bajos (de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  torr), ya que las partículas cargadas interactúan con los componentes de la atmósfera y son destruidas.

##### **1.4.2.1. Sistemas de entrada de la muestra.**

Los sistemas de entrada sirven para introducir una pequeña cantidad de muestra en el espectrómetro con una mínima pérdida de vacío y disponen en general de algún sistema para volatilizar las muestras sólidas y líquidas.



En la espectrometría de masas tradicional existen dos tipos principales de sistemas, los indirectos y los de entrada por sonda directa. En los sistemas indirectos de entrada la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la zona de ionización que está a baja presión a través de un diafragma de metal o de vidrio que contiene uno o varios orificios pequeños. En los sistemas de entrada por sonda directa la muestra se pone en la superficie de un vidrio o en un tubo capilar de aluminio o un alambre fino. La muestra se calienta o se enfría en la sonda y se coloca a pocos milímetros de la fuente de ionización. La baja presión en el área de ionización y la proximidad de la muestra a la fuente de ionización hace posible obtener espectros de compuestos térmicamente inestables antes de que se descompongan.

Actualmente los sistemas de entrada más habituales son más complejos, diseñados para hacer posible el acoplamiento de las columnas cromatográficas o de electroforesis capilar al espectrómetro de masas.

#### **1.4.2.2. Fuentes de iones.**

Las fuentes de iones se utilizan para transformar los componentes de una muestra en iones y se pueden clasificar de diversos modos. El más utilizado las divide en fuentes de fase gaseosa y fuentes de desorción. En las primeras se volatiliza primero la muestra y luego se ioniza. En el segundo tipo, sin embargo, la muestra sólida o líquida se transforma directamente en iones gaseosos. Las fuentes de fase gaseosa sólo se pueden aplicar a compuestos térmicamente estables, por lo que en la práctica sólo se pueden usar con compuestos de peso molecular menor de aproximadamente 100 daltons. Dentro de ellas están las fuentes de impacto de electrones, las de ionización química y las de ionización por campo. Las fuentes de desorción son aplicables a compuestos de mayor peso molecular e incluyen las fuentes de desorción por campo, las de ionización por electronebulización, las de desorción/ionización asistida por una matriz, las de desorción por plasma, las de bombardeo con átomos rápidos o las de ionización por termonebulización [148].

Otra clasificación habitual de las fuentes de iones es la de fuentes duras y blandas. Las primeras producen iones fragmentados con una relación  $m/z$  menor

que la del ión molecular, aportando información estructural y de los diversos grupos funcionales presentes en las moléculas. Por otro lado, las fuentes blandas dan lugar a poca fragmentación, siendo útiles para la determinación de pesos moleculares exactos.

### **1.4.2.3. Analizadores de masas.**

Los analizadores de masas sirven para separar los iones con diferente relación  $m/z$ . Estos componentes se diseñan para detectar diferencias de masa muy pequeñas y para permitir el paso de un número de iones suficiente que produzca en el detector una corriente iónica fácil de medir. Existen diversos tipos de analizadores de masa, como los de sector magnético, los de doble enfoque, los cuadrupolares, los de tiempo de vuelo y los de trampa iónica [102].

Los analizadores de sector magnético utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de electrones procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria circular a través de un tubo metálico. Debido a su diferente energía cinética se pueden diferenciar los iones más pesados de los más ligeros. Además la corriente del imán se puede variar haciendo posible la separación de distintos iones. Los espectrómetros de doble enfoque combinan campos magnéticos y electrostáticos, consiguiendo una mayor precisión que los analizadores magnéticos.

Los espectrómetros de masas cuadrupolares presentan cuatro cilindros paralelos que actúan como electrodos. Los cilindros opuestos se conectan eléctricamente, un par se une al polo positivo de una fuente de corriente continua y el otro par al polo negativo. Por otro lado, a cada par de barras se le aplican potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, desfasados 180 grados. Aplicando estos dispositivos se consigue que sólo los iones que presenten un determinado valor de  $m/z$  alcancen el detector, puesto que todos los restantes inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras.

En los analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF) los iones se producen de manera periódica mediante el bombardeo de la muestra con impulsos cortos de electrones, iones secundarios o fotones generados por láser. Los iones formados se

aceleran mediante un impulso de campo eléctrico y pasan a un tubo analizador que no está sometido a ningún campo, con una longitud de aproximadamente un metro. La velocidad que presentan los iones dentro del tubo dependerá de su masa, llegando al detector antes los iones más ligeros.

Los analizadores de trampa iónica constan de un espacio físico en el que se confinan los iones que proceden de la fuente, y donde son sometidos a un barrido del potencial de radiofrecuencia que atrapa a los iones hasta que se desestabilizan y pasan al detector.

#### **1.4.2.4. Detectores.**

Los detectores sirven para transformar los iones procedentes del analizador de masas en una señal eléctrica, que puede ser procesada, almacenada y mostrada de diferentes maneras, con la ayuda de dispositivos de almacenamiento y tratamiento de datos. Existen diversos tipos, siendo los más habituales los canales multiplicadores de electrones, la copa de Faraday y los detectores tipo centelleo.

#### **1.4.3. LC/MS (cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas).**

La combinación de HPLC y MS resulta interesante porque hace posible la separación de moléculas presentes en una mezcla compleja (HPLC) junto con su identificación y cuantificación precisas (MS). El principal problema para acoplar ambas técnicas radica en el contraste que existe entre los volúmenes de disolvente que salen de la columna de cromatografía y los requerimientos de vacío del espectrómetro de masas. Para solucionar este problema se han diseñado diversas interfases.

En un primer momento [148] se diseñaron varios tipos de interfases que, si bien fueron útiles para ciertas aplicaciones concretas, no sirvieron para solucionar de manera global el acoplamiento entre HPLC y MS. En este grupo se pueden mencionar la interfase de cinta móvil y la de introducción directa de líquidos. En la

primera de ellas el flujo de salida de la columna cromatográfica se coloca sobre una cinta transportadora móvil que lo lleva hasta una zona de calentamiento en la que se produce la evaporación de los diferentes analitos y/o de la fase móvil, en función del sistema de ionización empleado. Esta interfase presenta muchos problemas de construcción y de mantenimiento, pues la cinta transportadora tiene una longitud finita y un recorrido circular, de tal manera que se necesita un procedimiento de limpieza capaz de evitar todo tipo de contaminaciones cruzadas. Además la necesidad de emplear altas temperaturas para evaporar la fase móvil y así transportar los analitos hasta la fuente de iones del espectrómetro origina problemas si se necesita analizar compuestos térmicamente inestables. En la interfase de introducción directa de líquidos el flujo de salida de la columna cromatográfica pasa a lo largo de una sonda que presenta un microorificio que coincide con la fuente de iones del espectrómetro de masas. Según cuáles sean el flujo de salida y las condiciones de vacío se introducirá una porción diferente de fase móvil en la fuente de iones, donde se producirá la ionización química. Esta interfase presenta problemas de sensibilidad, debido a la ionización de sólo una pequeña porción del flujo de salida de la columna cromatográfica, y de mantenimiento, debido al posible taponamiento del orificio de entrada a la fuente de iones.

En la actualidad la mayor parte de los instrumentos diseñados para LC/MS emplean interfases en las que la ionización se realiza a presión atmosférica (API), pasando a continuación los iones a las zonas del espectrómetro de masas que se encuentran a elevado vacío [179]. Fundamentalmente se pueden describir tres métodos de ionización a presión atmosférica: la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI).

En la ESI el flujo que sale de la columna cromatográfica se introduce en un nebulizador, al que se le aplica una elevada carga eléctrica, generándose a su salida un aerosol de gotas microscópicas cargadas. A continuación se produce una evaporación hasta que el tamaño de las gotas es tal que existe una densidad de carga suficiente para que se liberen iones de la muestra de la superficie de las gotas. Así se generan iones con una o más cargas eléctricas que se introducen en el analizador de masas.

En la APCI el flujo de salida de la columna, formado por muestra y disolvente, se evapora en un nebulizador calentado. A continuación esta fase gaseosa es sometida a una descarga en corona, formándose principalmente iones de disolvente. Por último, estos iones reaccionan con las moléculas de la muestra, produciéndose transferencias de protones entre ambos y generándose iones positivos y negativos de la muestra original. A menudo esta interfase se emplea para moléculas estables térmicamente que necesitan mucha energía de ionización.

La APPI es similar a la APCI, excepto por el hecho de que usa fotones para ionizar las moléculas de la muestra, aplicando mayores energías de ionización.

En todos los métodos de API es esencial un correcto diseño de la interfase entre la zona a presión atmosférica y la zona a vacío, que haga posible el mantenimiento de las presiones adecuadas para cada una de ellas y el paso de la mayor cantidad posible de iones de interés. Este diseño suele ser característico de cada uno de los fabricantes de equipos de LC/MS.

#### **1.4.4. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).**

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consiste en el acoplamiento en serie de dos analizadores de masas y presenta cada vez un mayor número de aplicaciones. En el primer analizador se identifican una serie de iones moleculares (llamados iones padre), que pasan a una cámara de colisión en la que se bombea un gas (helio, argón, nitrógeno) que colisiona con los iones padre dando lugar a numerosos iones hijo. En el segundo analizador se obtiene el espectro de estos iones hijo.

Existen distintos modos de operación en un espectrómetro de masas en tándem [179], útiles para diferentes aplicaciones:

- a) Espectro de ión hijo (product ion scan): en este caso en el primer analizador se selecciona una única masa/carga (ión padre), que es la que se permite pasar a la cámara de colisión. En el segundo analizador se realiza un barrido por todas las relaciones  $m/z$  detectables, determinando cuáles son las masas de los iones hijo producidos en la cámara de colisión. Este modo de funcionamiento resulta útil

para caracterizar la estructura de los iones padre, así como para determinar las condiciones adecuadas que consiguen maximizar la cantidad de cada uno de los iones hijo formados.

- b) Espectro de ión precursor (precursor ion scan): en este modo de operación se selecciona una única masa/carga (ión hijo) en el segundo analizador, mientras que en el primero se realiza un barrido para determinar todos los iones padre presentes en la muestra que puedan dar lugar al ión hijo seleccionado. Este modo sirve para proporcionar información estructural así como para confirmar datos procedentes del espectro de ión hijo.
- c) Monitorización de múltiples reacciones (MRM, multiple reaction monitoring): en este caso en el primer analizador se permite el paso de una única masa/carga (ión padre) y en el segundo se detecta la presencia de una única masa/carga (ión hijo). De este modo se consigue una mayor sensibilidad para la pareja padre/hijo (transición), por lo que es el modo que se suele emplear en aplicaciones forenses o toxicológicas, análisis medioambientales, farmacológicos,...
- d) Espectro de pérdida constante de fragmentos neutros (neutral loss scan): en este modo se realiza en ambos analizadores un barrido de manera sincronizada para detectar las parejas padre/hijo debidas a la pérdida de un fragmento o grupo funcional neutro. Este modo resulta útil para detectar en una mezcla compleja compuestos de un mismo tipo que presenten un patrón de fragmentación común.

En la actualidad los fabricantes de este tipo de equipos están diseñando nuevas combinaciones, con distintos analizadores de masa en serie, para conseguir mayor sensibilidad y versatilidad en sus aplicaciones.

## ***2. Objetivo***

El objetivo de la presente tesis doctoral es desarrollar métodos para el aislamiento y la detección de ficotoxinas marinas. Se pondrá a punto la polarización de la fluorescencia como técnica analítica base para diseñar métodos rápidos y asequibles de detección de toxinas.

Se estudiará la unión entre las yessotoxinas y las fosfodiesterasas celulares mediante la polarización de la fluorescencia, con el fin de obtener un método para cuantificar estas ficotoxinas. Además se pondrán a punto métodos de extracción y limpieza de las yessotoxinas a partir de muestras contaminadas. Por otro lado, se desarrollará un procedimiento para la purificación a gran escala de azaspirácidos a partir de mejillones contaminados con varias toxinas lipofílicas y se investigará la estabilidad de las toxinas obtenidas. La finalidad de este estudio es disponer de elevadas cantidades de compuestos puros para obtener estándares de alta calidad.



### ***3. Publicaciones***

### **3.1. Presentación.**

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la tesis doctoral, publicados en revistas internacionales. Dichos resultados van acompañados de la descripción de la metodología científica utilizada y de las conclusiones obtenidas en cada caso. Las cuatro publicaciones que se presentan están relacionadas tanto con la detección como con el aislamiento de ficotoxinas marinas, por lo que esta sección se divide en:

#### **Parte I: Diseño de un método para la detección de YTXs en moluscos contaminados.**

En el laboratorio de Farmacología se había descrito con anterioridad la unión entre las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos celulares y las YTXs. Basándose en este hecho se utilizó la fluorescencia de polarización para diseñar un método de detección de este grupo de toxinas. En primer lugar se puso a punto esta tecnología analítica estudiando la unión de avidina y biotina, marcando una de las dos especies con un derivado fluorescente. A continuación se utilizó la fluorescencia de polarización para detectar la unión de la YTX y las fosfodiesterasas I y II marcadas con un derivado de la fluoresceína, observando que era posible cuantificar la cantidad de toxina existente en un medio control. Posteriormente se realizó un análisis de los distintos métodos de extracción de las YTXs a partir de muestras de mejillón contaminado, determinando cuáles eran los más adecuados por no presentar efecto matriz en el método de detección. Durante este análisis también se diseñó un procedimiento de limpieza para reducir las interferencias de los extractos en la fluorescencia de polarización. Finalmente el conjunto formado por el método de extracción y limpieza y el método de detección se validó con muestras de mejillón contaminado durante una marea roja, observándose que no sólo era adecuado para cuantificar la yessotoxina presente en la muestra, sino también otros análogos como la homoyessotoxina y la hidroxiyessotoxina.

A esta parte corresponden las publicaciones:

- I.1. Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure.
- I.2. Extraction and cleaning methods to detect yessotoxins in contaminated mussels.

## **Parte II: Diseño de un método para la purificación de AZAs a partir de mejillones contaminados.**

Los AZAs son un grupo de toxinas de reciente descripción y amplia distribución geográfica. Sin embargo, la ausencia de estándares puros de los diferentes análogos de este grupo ha hecho imposible el estudio en profundidad de su mecanismo de acción y de su toxicología. En el laboratorio de Farmacología se disponía de mejillones contaminados con toxinas DSP y AZAs procedentes de una marea roja de Irlanda. Con este material se puso a punto un método de purificación a gran escala de los diferentes análogos de AZAs. Se diseñó un procedimiento que consta de tres etapas consecutivas: una extracción de la muestra de mejillón con varios disolventes orgánicos, una separación en fase sólida para aislar los AZAs de las toxinas DSP y una cromatografía líquida para purificar cada uno de los análogos. En el transcurso de la purificación se observó una relación entre la estabilidad de los AZAs y la temperatura de secado durante el proceso de separación. Por ello se llevó a cabo un estudio sobre la influencia de la temperatura y el pH en la estabilidad de los distintos análogos aislados.

A esta parte corresponden las publicaciones:

- II.1. Purification of five azaspiracids from mussel samples contaminated with DSP toxins and azaspiracids.
- II.2. Evaluation of various pH and temperature conditions on the stability of azaspiracids and their importance in preparative isolation and toxicological studies.

**I.1. Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure.**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Analytical Biochemistry 344 (2005) 266–274

ANALYTICAL  
BIOCHEMISTRY[www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

## Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure

Carmen Alfonso<sup>a</sup>, Amparo Alfonso<sup>a</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>b</sup>, Takeshi Yasumoto<sup>c</sup>,  
Luis M. Botana<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, USC, 27002 Lugo, Spain<sup>b</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, USC, 27002 Lugo, Spain<sup>c</sup> Japan Food Research Laboratories, Tama, Tokyo 206-0025, Japan<sup>d</sup> Community Reference Laboratory of Marine Biotoxins (CRLMB), 36271 Vigo, Spain

Received 2 June 2005

Available online 14 July 2005

### Abstract

Yessotoxin (YTX) is a polycyclic ether toxin produced by phytoplanktonic microalgae from the group of dinoflagellates. It has been shown that YTX increases the 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) activity and that there is a binding between these proteins and the toxin. Fluorescence polarization (FP) is a spectroscopic technique that can be used to study the interactions between molecules. It is based on exciting a fluorescent molecule with plane-polarized light and measuring the polarization degree of the emitted light. In this study, the FP is applied to the study of the interaction between YTX and phosphodiesterases I and II (PDE I and II). The phosphodiesterases are labeled with a reactive succinimidyl ester of carboxyfluorescein, and the FP of the protein–dye conjugate is measured when the YTX concentration in the medium increases. The results show that in both cases the fluorescence polarization of the conjugates decreases when they bind to YTX. For the PDE I, it is possible to draw a Gaussian curve or a straight line that relates the two variables (FP and YTX concentration). The concentration of this toxin in a spiked mussel extract (which contains the conjugate) can be quantified measuring its FP and using the equations of those lines. Different extraction methods are tried in this study, and those that can be used to obtain an appropriate mussel extract to be quantified with this technique are determined.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Polarization; Fluorescence; Detection; Yessotoxin; Phosphodiesterase

Obtaining safe food is essential to guarantee the health of humans and animals. In this context, the detection of natural or synthetic pollutants in food through reliable methods is an important field of study. Our interest is focused on the detection of toxins in shellfish, and this article deals specifically with yessotoxin (YTX).

YTX is a polycyclic ether toxin, the first evidence of which was found in Mutsu Bay, Japan [1]. It was originally isolated from the hepatopancreas of the scallop *Patinopecten yessoensis* [1], and it is produced by microalgae from the group of dinoflagellates, specifically *Protoceratium reticulatum* [2] and *Gonyaulax polyedra* [3,4]. Its planar structure was determined in 1987 by NMR techniques

\* Corresponding author. Fax: +34 982 252 242.

E-mail address: [luis.botana@lugo.usc.es](mailto:luis.botana@lugo.usc.es) (L.M. Botana).

<sup>1</sup> Abbreviations used: YTX, yessotoxin; DSP, diarrhetic shellfish poisoning; PSP, paralytic shellfish poisoning; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PDE, phosphodiesterase; FP, fluorescence polarization; NMWL, nominal molecular weight limit; DMSO, dimethyl sulfoxide; PBS, phosphate-buffered saline; mP, millipolarization units; ANOVA, analysis of variance; PP2A, phosphatase 2A; EF–Tu, elongation factor Tu; EF–Ts, elongation factor Ts.

[1], and the absolute configuration was reported later [5,6]. There are various natural compounds belonging to the YTX class, all of them having 11 contiguous ether rings, an unsaturated side chain, and one or more sulfate groups.

Initially, YTXs were described as a kind of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins because they coexist in shellfish and are extracted together with organic solvents. However, toxicological studies showed that YTX does not cause diarrhea and does not kill mice by oral administration, even at 1 mg/kg (which is 10 times the lethal dose by intraperitoneal injection), so it should not be included in the DSP category [7]. The specific toxicology of YTX might be associated with its sulfate groups. The toxin acts as an amphiphilic molecule due to its sulfate groups, and this characteristic could influence its absorption from the digestive tract [8].

It is necessary to design a reliable and reproducible method to quantify YTX in shellfish samples because the presence of this toxin has toxicological concerns and can produce false-positive results in the mouse bioassay used to detect DSP. European legislation establishes a maximum level of YTXs in bivalve mollusks, echinoderms, tunicates, and marine gastropods (the whole body or any part edible separately) of 1 mg of YTX equivalent/kg [9]. Nowadays, the method in current use to detect YTX is the original biological mouse bioassay [10] or one of its modifications [11,12]. The original one has some problems because the presence of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins and free fatty acids in the sample can cause false-positive results [13]. The first modification [11] achieves the elimination of the PSP toxins, whereas the second one [12] removes the free fatty acids. All of the mouse bioassays have some problems. On the one hand, they are time-consuming and have economic concerns; on the other hand, the use of analytical methods is always preferable to the use of animals. YTX can also be detected through other methods such as LC–MS [14], HPLC with fluorimetric detection [15,16], and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [17]. Perhaps the best choice is the design of a method based on the specific properties of the toxin. It has been shown that YTX decreases cAMP levels due to an increase in 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) activity [18], and recently the binding between YTX and PDEs using an optical biosensor was described [19]. Our interest is focused on the design of a detection method based on this binding by using fluorescence polarization (FP).

FP is a spectroscopic technique described by Perrin in 1926 [20]. One of the most important applications of FP is the study of molecular interactions. A value for the FP of a molecule is measured, and then another molecule that perhaps will bind the first one is added to the medium. If this binding occurs, the two values of FP will be different because the movement of the dye will have changed. If this does not take place, no binding can be concluded [21].

The aim of the current work is to study the interaction between YTX and PDEs using the FP technology. This can lead to a new detection method for this toxin that would be easier, faster, and more reliable than the mouse bioassay and without the cost and equipment bound to biosensors.

## Materials and methods

### Chemicals

YTX was purified by the fourth author (T. Yasumoto), and an approximately 300- $\mu$ M YTX solution in methanol was also used. Phosphodiesterase I (PDE I, type IV from *Crotalus atrox*, EC 3.1.4.1) and phosphodiesterase II (PDE II, type I-SA from bovine spleen, EC 3.1.16.1) were obtained from Sigma (Spain). A FluoroSpin 498 Protein Labeling and Purification Kit was obtained from EMP Biotech (Germany).

Acetone and chloroform were obtained from Merck (Spain), methanol and ethanol were purchased from Panreac (Spain), and dichloromethane was obtained from Prolabo (Spain). Silica sep-cartridges (600 mg) were obtained from Lida Manufacturing (Spain), and Ultrafree-CL filters (10,000 nominal molecular weight limit [NMWL] and low-binding regenerated cellulose as membrane) were purchased from Millipore (Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Tween 20 solution were obtained from Sigma.

The composition of the saline solution (phosphate-buffered saline [PBS]) used in the experiments was as follows: 137 mM NaCl, 8.2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 3.2 mM KCl, with the final pH adjusted to 7.4 using NaOH. All of these chemicals were obtained from Panreac except  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , which was purchased from Merck (Spain).

### Protein labeling

A reactive succinimidyl ester of carboxyfluorescein, FAM, is used to label the PDEs. When this dye reacts with an amine group of a protein, it forms a covalent amide linkage. The resultant protein–dye conjugates have absorption and fluorescence emission maxima at 495–499 and 518–523 nm, respectively. The kit contains all of the chemicals and tools used during the labeling and purification processes.

The protein is mixed with a sodium bicarbonate solution, the dye is added, and then the mixture reacts for 1 h at room temperature while protected from light. Afterward, a hydroxylamine solution is added to stop the labeling, and it reacts for 30 min.

The purification process consists of isolating the protein–dye conjugates using spin columns. The conjugates

can be stored for a long time in frozen aliquots at  $-20^{\circ}\text{C}$  while protected from light.

#### Fluorescence polarization

The Plate Chameleon instrument from Hidex (Finland) is used to measure the FP. It can do six different readings, including the fluorescence intensity and the FP, working with microplates. In this case, 96-well microplates of black polystyrene (Costar, Spain) are used.

The light source is a xenon flash lamp with a closed-loop intensity control. The detectors are photomultipliers and photodiodes, and it uses filters and polarization filters (for FP) to select the correct wavelength. In this case, the filters of 485 nm for excitation and 535 nm for emission are used to measure the fluorescence intensity, and the polarization filters of the same wavelength are used to measure the FP. The results can be downloaded to the Hidex data analysis software or to Excel. Before measuring, the microplates are shaken in a Thermostar (BMG Labtechnologies, Germany).

The fluorescence intensity can be measured after setting a value for the gain, so that the obtained readings were between 10 and 200,000 fluorescence units. The polarization degree of the emitted light (measured in millipolarization units [mP]) is calculated by the following equation:

$$\text{mP} = 1000 \left[ \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \right] \quad (1)$$

where  $I_{\parallel}$  is the fluorescence intensity measured with vertical excitation and vertical emission polarization filters (called parallel intensity),  $I_{\perp}$  is the fluorescence intensity measured with vertical excitation and horizontal emission polarization filters (called perpendicular intensity), and  $G$  is a correction factor used because the optical components of the instrument affect the beam of light depending on its polarization plane. It is determined by measuring a dilution series of the fluorophore with an FP protocol and modifying  $G$  until the mP values obtained are between 20 and 30.

#### Processing of mussel samples

Uncontaminated mussels were opened, and the meat and digestive glands were collected in two piles and homogenized. Four methods were used to obtain the mussel extract.

##### Method 1

Homogenate from the digestive glands was extracted three times with acetone. Each time the extract was filtered by vacuum, and the three extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was diluted in water and extracted three times with dichloromethane. The three organic phases were mixed and extracted twice

with water, and the final organic phase was vacuum dried [11]. The dried extract was dissolved with chloroform/methanol (9:1) and charged to a silica cartridge. This was washed with the same solvent and then was eluted with chloroform/methanol (4:6). The final extract was divided into five vials, and they were evaporated until dryness. Each of these five residues was dissolved in a different solvent: PBS, DMSO, ethanol, methanol, or Tween 20 (1% in water). Finally, the residues were filtered using a cellulose membrane (after dilution with PBS), and a part of them was contaminated with YTX. This mussel extract is referred to here as M1.

##### Method 2

Homogenate from the digestive glands was extracted three times with acetone. Each time the extract was filtered by vacuum, and the three extracts were mixed and vacuum dried [9]. The dried extract was dissolved with chloroform/methanol (9:1) and charged to a silica cartridge. This was washed with the same solvent and then was eluted with chloroform/methanol (4:6). The final extract was divided into five vials, and they were evaporated until dryness. Each of these five residues was dissolved in a different solvent: PBS, DMSO, ethanol, methanol, or Tween 20 (1% in water). Finally, the residues were filtered using a cellulose membrane (after dilution with PBS), and a part of them was contaminated with YTX. This mussel extract is referred to here as M2.

##### Method 3

Homogenate from the meat was extracted with acetone. The meat extract was filtered by vacuum and extracted again with methanol. Acetone and methanol extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was diluted in water and extracted with dichloromethane. The final watery phase was extracted with dichloromethane, and the two organic phases obtained were mixed and vacuum dried [22]. The dried extract was dissolved with chloroform/methanol (9:1) and charged to a silica cartridge. This was washed with the same solvent and then was eluted with chloroform/methanol (4:6). The final extract was divided into five vials, and they were evaporated until dryness. Each of these five residues was dissolved in a different solvent: PBS, DMSO, ethanol, methanol, or Tween 20 (1% in water). Finally, the residues were filtered using a cellulose membrane (after dilution with PBS), and a part of them was contaminated with YTX. This mussel extract is referred to here as M3.

##### Method 4

Homogenate from the digestive glands was extracted with 80% methanol [23]. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant was collected, and 80% methanol was added (until a final proportion of 5 ml of 80% methanol for each gram of

digestive glands). This final extract was evaporated until dryness. The dried extract was dissolved with chloroform/methanol (9:1) and charged to a silica cartridge. This was washed with the same solvent and then was eluted with chloroform/methanol (4:6). The final extract was divided into five vials, and they were evaporated until dryness. Each of these five residues was dissolved in a different solvent: PBS, DMSO, ethanol, methanol, or Tween 20 (1% in water). Finally, the residues were filtered using a cellulose membrane (after dilution with PBS), and a part of them was contaminated with YTX. This mussel extract is referred to here as M4.

#### Data analysis

All of the experiments were carried out at least three times by duplicate. Data were normalized, and results were expressed as means  $\pm$  SEM. Results were analyzed using the Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA). A probability level of 0.05 or less was used for statistical significance.

#### Results

As stated previously, the interaction between 3', 5'-cyclic nucleotide PDEs and YTX has been described [18,24], as have their binding parameters [19]. Because the FP is a good technique to study molecular interactions [25], we use it to describe the relationship between YTX and PDEs I and II.

First, the interaction between YTX and PDE I was checked. Initially, the protein was labeled using a protein concentration of 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . The final conjugate (PDE I-F) is dissolved in PBS buffer. The degree of labeling is 0.8 molecules of dye per molecule of protein. To select the correct dilution factor to perform the experiments and its volume, it was necessary to measure the fluorescence intensity of a dilution series of the protein solution obtained from the labeling reaction (protein stock solution). After this (data not shown), we chose a dilution factor of 1:5000; that is, the concentration of PDE I remained constant in all of the experiments. In these conditions, the correct values (experimentally obtained) for *G* and gain were 0.89 and 40, respectively.

To study the interaction of YTX and PDE I using FP, a variable amount of YTX was added to a PBS medium with a constant concentration of PDE I-F conjugate. As Fig. 1A shows, the mP units decrease when toxin concentration increases from 165 to 90 mP units. These results can also be plotted as a percentage response in the measured variable with regard to the control response (concentration 0 of YTX) versus the toxin concentration. The graphic (Fig. 1B) follows the same profile as does Fig. 1A: FP decreases when YTX concentration in the medium increases until it reaches a

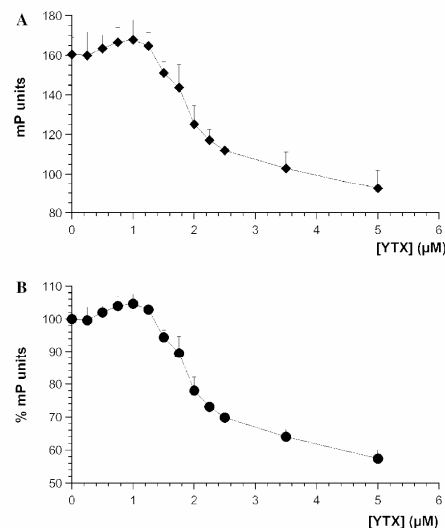


Fig. 1. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate. Different concentrations of YTX were added to a constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate. (A) Raw mP units from FP reader. (B) Data from (A) expressed as percentage response in relation to control response (obtained in the absence of YTX in the medium). FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments.

value of 57% with 5  $\mu\text{M}$  YTX (the highest concentration tested). The information provided by polarization fluorescence (Fig. 1) is lost when total fluorescence intensity is the parameter to consider, as shown in Fig. 2A. This spectroscopic characteristic remains in a constant average value, with slight fluctuations that cannot be related to the concentration of YTX.

In each sample, the concentration of YTX was obtained through the dilution of a stock solution of YTX in DMSO (1 mM) with PBS buffer; therefore, the DMSO interference is checked. The FP of a dilution series of DMSO in which the range of DMSO concentration (v/v) matches the corresponding values of YTX concentrations tested previously was measured. These results appear in Fig. 2B. The FP of the conjugate in the medium with DMSO remains nearly constant, without any obvious change when the concentration of this solvent increases. Therefore, the decrease of FP obtained previously (Fig. 1) is caused only by the YTX on the sample.

The results from Fig. 1 that relate the FP of a sample of PDE I-F conjugate with its YTX concentration can be fitted as a Gaussian curve (Fig. 3A) or as a straight line (Fig. 3B). The first one includes a larger YTX range, whereas the second one corresponds only to the points that have linear behavior. The two plots can be used to



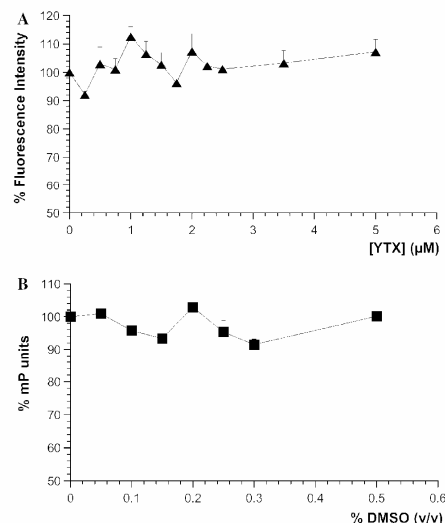


Fig. 2. (A) Effect of YTX on fluorescence intensity of PDE I-F conjugate. Different concentrations of YTX were added to a constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate. Fluorescence intensity was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. (B) Effect of DMSO on FP units (mP) of PDE I-F conjugate. Different concentrations of DMSO (corresponding to the interval of DMSO added in YTX samples from Fig. 1) were added to a constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments.

calculate the amount of YTX in a problem sample (in the presence of the PDE I-F conjugate), with each one having its specific dynamic range.

Then the binding of YTX with a different PDE, PDE II, was checked. This protein was labeled using the conditions described for PDE I, with an initial protein concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . In this case, the degree of labeling is 1.2 molecules of dye per molecule of protein, and the correct dilution factor is fixed in 1:500, with the same values for  $G$  and gain as reported previously. Fig. 4 shows the results for the interaction of YTX and PDE II in the same conditions as PDE I. As Fig. 4A shows, FP decreases until it reaches a constant value of 75% for 2.5  $\mu\text{M}$  of YTX. The shapes of the plots for the two PDEs tested (Figs. 1 and 4) are not the same; YTX causes a smaller decrease of FP, and shows higher variability, with PDE II. The influence of YTX on the fluorescence intensity of the PDE II-F conjugate appears in Fig. 4B. The results fluctuate when YTX concentration increases. In this case, there is not a constant average value, and the SEM values are very high. The change in total fluorescence intensity suggests that more complex interactions are taking place. Therefore, this PDE is

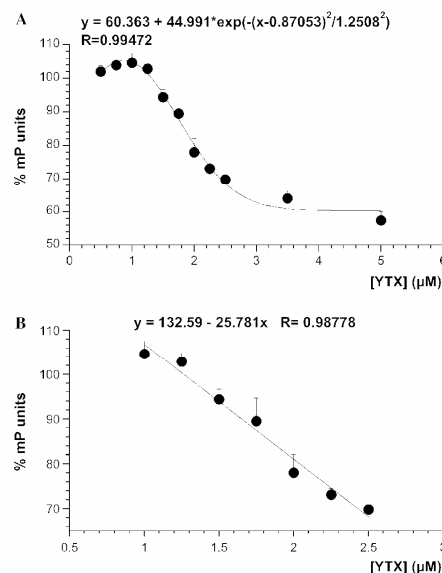


Fig. 3. Variations in FP units (mP) of PDE I-F conjugate induced by different YTX concentrations. Data from Fig. 1 are fitted as a Gaussian curve (A) or as a linear regression (B).

probably not the best option to be used in this method. The influence of DMSO was checked, and again no effect was reported (results not shown). Finally, results from Fig. 4A were fitted as a straight line (Fig. 4C). In this case, the  $R$  value and slope are small, suggesting that this equation is not appropriate to quantify YTX concentration.

All of these experiments were carried out with pure YTX. We also used a 290- $\mu\text{M}$  solution of YTX in methanol (with a lower degree of purity) that is referred to here as TOX. We quantified the toxin concentration of this solution using the PDE I-F conjugate. First, the toxin solution was concentrated, dissolved in DMSO, and cleaned using a cellulose membrane. Two different concentrations of the final toxin solution were checked: 1.5  $\mu\text{M}$  (TOX A) and 2  $\mu\text{M}$  (TOX B). They were added to a PBS medium that contains the PDE I-F conjugate. The FP of these samples is measured in the conditions used previously for pure YTX. The TOX concentrations are obtained using the equations of the Gaussian curve and the straight line that relates the percentage mP units of the PDE I-F conjugate and the YTX concentration. The concentrations obtained for TOX A were  $1.41 \pm 0.2$  and  $1.37 \pm 0.21$   $\mu\text{M}$  for the Gaussian and straight-line equations, respectively. In the case of TOX B, the values were  $1.76 \pm 0.11$  and  $1.71 \pm 0.12$   $\mu\text{M}$ , respectively. TOX

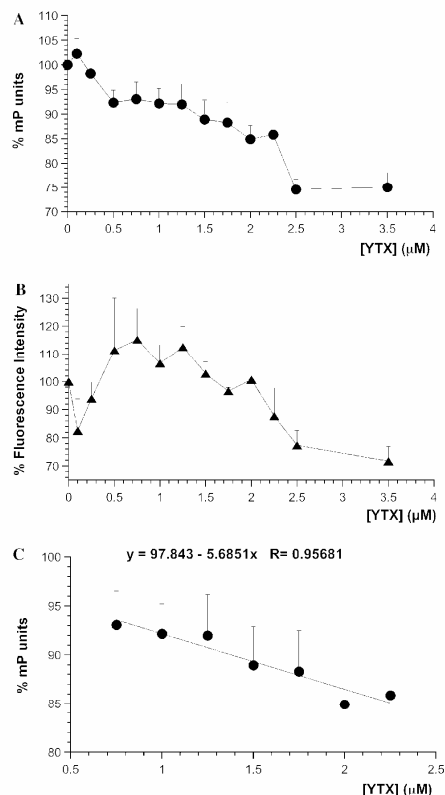


Fig. 4. (A) Effect of YTX on FP units (mP) of PDE II-F conjugate. Different concentrations of YTX were added to a constant amount of fluorescent PDE II-F conjugate. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. (B) Effect of YTX on fluorescence intensity of PDE II-F conjugate. Different concentrations of YTX were added to a constant amount of fluorescent PDE II-F conjugate. Fluorescence intensity was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. (C) Variations in FP units (mP) of PDE II-F conjugate induced by different YTX concentrations. Data from (A) are fitted as a linear regression.

concentrations are close to the theoretical ones; hence, this is an adequate detection method for YTX in PBS medium.

Then the detection method was tested in mussel samples. Because there is no reported study of YTX extraction methods for *in vitro* detection, both the extraction method and the solvent were checked. We used four different mussel extracts dissolved in five solvents. To use the FP as the YTX detection method, the FP values of the PDE I-F conjugate must be the same in the mussel

extract and in PBS, and these values must show measurable differences from those obtained in the YTX-contaminated mussel extract. Therefore, each extract is checked before and after spiking 2 μM YTX. PBS medium is used as the control. Results are plotted as percentage change in the measured variable (FP) versus control response obtained in PBS.

Fig. 5 shows the effect of five solvents in FP values of PDE I-F conjugate in the absence of YTX and in the presence of 2 μM YTX. In each case, the proportion of solvent in the final medium is the same as in the extracts. All of them are diluted to the final volume with PBS. In the uncontaminated media, the FP values of the conjugate in DMSO, methanol, and ethanol are similar to those obtained in PBS, whereas with Tween 20 the percentage mP units is significantly different. In the spiked material, all of the results are similar. For a specific medium, the FP values in the presence of YTX are different from those in the absence of YTX with respect to the spiked material with the exception of Tween 20.

Fig. 6 shows the extracts obtained with M1. In the uncontaminated samples, the FP values from the extracts dissolved in DMSO and Tween 20 are significantly different from those obtained in PBS. In the spiked material, all of the results are similar. Only the extracts dissolved in PBS and DMSO show a difference in the mP values in the presence and in the absence of YTX.

Fig. 7 shows the results with the extracts obtained with M2. We do not use Tween 20 because it has been shown previously that this solvent produces a change in the medium characteristics that affects the conjugate FP. In the uncontaminated media, the FP value of the

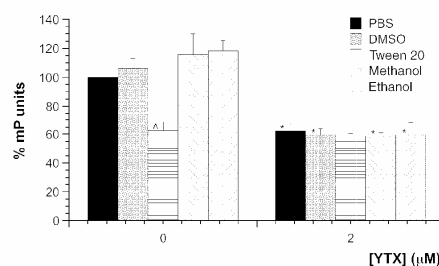


Fig. 5. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in five different media. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to five different media, each of them uncontaminated and contaminated with 2 μM YTX. Each medium consists of a percentage of PBS and a constant percentage of the other solvent used (DMSO, Tween 20, methanol, or ethanol) except for the control medium, which contains only PBS. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. \*Significant difference between a medium and the PBS medium with the same YTX concentration. \*Significant difference between the two YTX concentrations in the same medium.

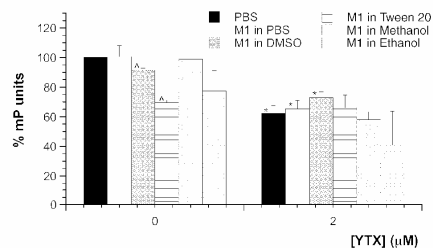


Fig. 6. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts (M1) dissolved in five different solvents. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to extracts M1 dissolved in five different solvents and then diluted with PBS, each of them uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. The control sample was PDE I-F conjugate in PBS, uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. <sup>^</sup>Significant difference between a medium and the PBS medium with the same YTX concentration. \*Significant difference between the two YTX concentrations in the same medium.

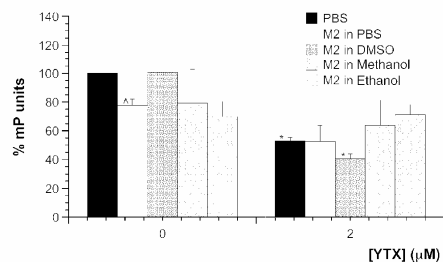


Fig. 7. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts (M2) dissolved in four different solvents. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to extracts M2 dissolved in four different solvents and then diluted with PBS, each of them uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. The control sample was PDE I-F conjugate in PBS, uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. <sup>^</sup>Significant difference between a medium and the PBS medium with the same YTX concentration. \*Significant difference between the two YTX concentrations in the same medium.

conjugate in the extract dissolved in PBS is different from that obtained in PBS without the extract. In the contaminated media, all of the results are similar. The FP values in the presence and in the absence of YTX are different for the extract in DMSO.

As Fig. 8 shows, there are no differences in mP values of the conjugate in the absence and in the presence of toxin for any solvent checked when M3 is used. Therefore, this extraction method is not suitable to detect YTX in a mussel sample using the FP technique.

The results of the last method tried, M4, are shown in Fig. 9. In this case, only the extracts dissolved in PBS and DMSO are used because the previous extracts dis-

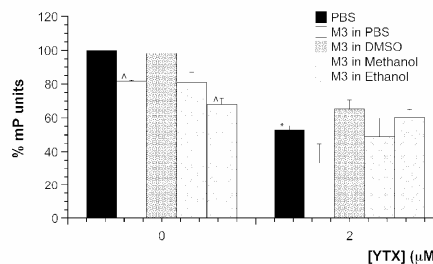


Fig. 8. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts (M3) dissolved in four different solvents. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to extracts M3 dissolved in four different solvents and then diluted with PBS, each of them uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. The control sample was PDE I-F conjugate in PBS, uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. <sup>^</sup>Significant difference between a medium and the PBS medium with the same YTX concentration. \*Significant difference between the two YTX concentrations in the same medium.

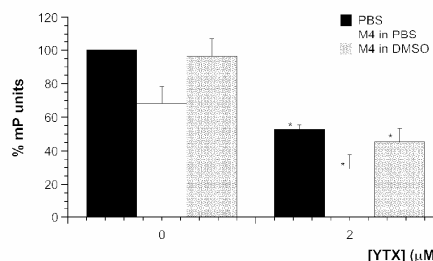


Fig. 9. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts (M4) dissolved in two different solvents. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to extracts M4 dissolved in two different solvents and then diluted with PBS, each of them uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. The control sample was PDE I-F conjugate in PBS, uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX. FP was measured after 5 min incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. \*Significant difference between the two YTX concentrations in the same medium.

solved in methanol and ethanol do not show different FP values in the presence and in the absence of YTX. With both extracts, the mP values of the conjugate are similar to those obtained in PBS without extract. Moreover, the FP in the media without toxin is significantly different from that measured in the contaminated media.

In sum, there are five extracts in which the FP values are different in the presence and in the absence of YTX: M1 in PBS and DMSO, M2 in DMSO, and M4 in PBS and DMSO. Therefore, PBS and DMSO are suitable solvents for the technique, whereas methanol, ethanol, and Tween 20 can affect the FP of the conjugate and must

not be used. M1, M2, and M4 can be used to detect YTX in mussel samples using the PDE I–F conjugate, whereas M3 is not appropriate.

## Discussion

The detection of marine toxins in food is important due to its danger for human health. For each of these toxins, there are several detection methods, each with its advantages and disadvantages based on chemical properties, structure, activities, and the like. We are interested in the detection of YTX. This toxin shows a low oral toxicity compared with its intraperitoneal toxicity and does not produce intestinal fluid accumulation, inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A), or hemolytic effects [7], so it is not included in the DSP category. Nevertheless, it can cause false-positive results in the mouse bioassay used to detect DSP. Nowadays, the method currently in use to detect YTX is the mouse bioassay as well, but it has ethical problems and shows low specificity, so it is possible to obtain false-positive or false-negative results. There are other methods, such as LC–MS [14], HPLC with fluorescence detection [15,16], and ELISA [17], but they have economic concerns due to the necessary technology (LC–MS and HPLC) or materials (the antibodies in ELISA); moreover, some of them do not detect all of the analogs of YTX. This is an important disadvantage that can be avoided by using a detection method based on the specific target of YTX. It has been shown that this toxin activates cAMP hydrolysis by 3', 5'-cyclic nucleotide-specific PDEs activation [18]. Using this property, a method to detect YTX has been developed [24]. Recently, it was proved that there is a binding between YTX and PDEs using a resonant mirror biosensor [19], and it was shown that there is an association between PDEs and different YTX analogs [26]. This is a kind of direct interaction that can be detected using FP. The necessary requirement to do it is that one of the two molecules involved in the binding (YTX or PDE) must be fluorescent, so it must be labeled previously with a fluorescent dye. The technology and materials used are not expensive, so it is a good method for current use in routine monitoring.

In this study, the interaction between YTX and PDE I (type IV from *C. atrox*) and PDE II (type I-SA from bovine spleen) was examined. The two proteins are labeled with a succinimidyl ester of carboxyfluorescein that forms a covalent amide linkage with an amine group of the proteins. The results show that the PDE I can be used to quantify, with a low detection limit, the YTX of a sample. This limit depends on the fluorescence of the protein–dye conjugate. If a protein with a higher degree of labeling could be obtained, it would be possible to reach a higher dilution to do the experiments, so lower concentrations of YTX could be detected. When the PDE II is tried, the rela-

tion between the toxin concentration and the FP of the sample is not as good as when the PDE I is tried. In the two cases, the FP of the protein–dye conjugate decreases when the concentration of the toxin in the medium increases. It can be concluded that the binding between the toxin and the two proteins produces this change in FP. The movement of the dye can be divided into two parts: global and local. Global motion decreases when the molecular volume increases, and this usually corresponds with an increase in the molecular weight, but this does not happen all of the time. For example, the FP of a dye bound to a DNA duplex is smaller than the FP of a dye bound to a single strand of DNA with the same molecular weight [27], perhaps due to the different volumes of the two structures. Local motion of the dye is another variable of great interest. For example, the FP of a tryptophan residue of a protein usually increases when it binds to another macromolecule, but this polarization can decrease if the local motion of the tryptophan increases appreciably on binding. This occurs when the elongation factor Tu (EF–Tu) binds to the elongation factor Ts (EF–Ts). In fact, the FP of the complex EF–Tu·GDP (with a molecular weight of 43,000) is greater than the FP of the complex EF–Tu·EF Ts (with a molecular weight of 74,000) [28]. A similar situation occurs when the polarization of a primer is greater than the polarization of the PCR product despite the greater size of the latter [29]. All of these references can be applied in our study, so we suggest that the binding between YTX and the labeled PDEs produces an increase in the local motion of the dye and thus a decrease in its FP. In this case, the local motion is important because covalent probes often experience considerable movement limited only by the three-dimensional structure, whereas noncovalently bound probes usually have several points of interaction and reduced mobility [30].

At this point, we have shown that the concentration of YTX in a PBS medium can be quantified using the FP and the binding between this toxin and the PDEs. A detection method based on this must be capable of quantifying the YTX of a shellfish sample without interferences of the matrix. We try to do this with mussel extracts obtained through four different methods (described previously by some authors and partially modified) dissolved in five different solvents. After all of the experiments, we believe that the extraction methods named as M1 and M4 can be used to obtain appropriate extracts that must be dissolved in PBS or DMSO. Also, the extract obtained through M2 dissolved in DMSO can be used. In these conditions, the added amount of YTX can be detected with a high degree of accuracy. The necessary experiments to complete this work must be done with naturally contaminated mussels in which the detection method is able to quantify the concentration of YTX using one of these extraction methods. This could not be done due to the lack of these naturally contaminated shellfish.

This article has described a new method to quantify the YTX concentration in a sample. This method is easy and economical, and it has a high degree of repeatability. The extraction methods required to obtain a mussel extract that does not interfere with this technique were also described. We have designed a new way in which to quantify YTX in mussels, namely an assay based on the binding between this toxin and the (fluorescently labeled) PDE I that uses the FP technique.

#### Acknowledgments

This work was funded with Grants SAF2003-08765-C03-02; REN2001-2959-C04-03; REN2003-06598-C02-01; AGI.2004-08268-02-02/A1.1; INIA CAI.01-068; Xunta PGIDT99INN26101, PGIDIT03AL26101PR, and PGIDIT04TAL261005PR; FISS REMA-G03-007; and VIth frame program FOOD-CT-2004-514055 and FOOD-CT-2004-06988.

#### References

- [1] M. Murata, M. Kumagai, J.S. Lee, T. Yasumoto, Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5869–5872.
- [2] M. Satake, L. MacKenzie, T. Yasumoto, Identification of *Protocerratum reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin, *Nat. Toxins* 5 (1997) 164–167.
- [3] M. Satake, A. Tubaro, J.S. Lee, T. Yasumoto, Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea, *Nat. Toxins* 5 (1997) 107–110.
- [4] R. Draisci, E. Ferretti, L. Palleschi, C. Marchiafava, R. Poletti, A. Milandri, A. Ceredi, M. Pompei, High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea, *Toxicon* 37 (1999) 1187–1193.
- [5] M. Satake, K. Terasawa, Y. Kadowaki, T. Yasumoto, Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 5955–5958.
- [6] H. Takahashi, T. Kusumi, Y. Kan, M. Satake, T. Yasumoto, Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl)acetic acid, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 7087–7090.
- [7] H. Ogino, M. Kumagai, T. Yasumoto, Toxicologic evaluation of yessotoxin, *Nat. Toxins* 5 (1997) 255–259.
- [8] R. Draisci, L. Lucentini, A. Masciari, Pectenotoxins and yessotoxins: Chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis, in: L.M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 289–324.
- [9] OJEC: Official J. Eur. Communities, Commission decision of 15 March 2002 (2002/225/EC) laying down detailed rules for the implementation of council directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates, and marine gastropods, *L. 75* (2002) 62–64.
- [10] T. Yasumoto, Y. Oshima, M. Yamaguchi, Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 44 (1978) 1249–1255.
- [11] T. Yasumoto, M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto, J. Clardy, Diarrhetic shellfish poisoning, in: E. Ragelis (Ed.), *Seafood Toxins*, ACS Symposium Series No. 262, American Chemical Society, Washington, DC, 1984, pp. 207–214.
- [12] C. Marcaillou-Le Baut, Toxins involved in diarrhetic shellfish poisoning DSP, *Oceanis* 16 (1990) 359–374.
- [13] Y. Hamano, Y. Kinoshita, T. Yasumoto, Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins, in: D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York, 1985, pp. 383–388.
- [14] H. Goto, T. Igarashi, M. Yamamoto, M. Yasuda, R. Sekiguchi, M. Watai, K. Tanno, T. Yasumoto, Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 181–189.
- [15] T. Yasumoto, A. Takizawa, Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1775–1777.
- [16] H. Ramstad, S. Larsen, T. Aune, Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay, *Toxicon* 39 (2001) 1393–1397.
- [17] L.R. Briggs, C.O. Miles, J.M. Fitzgerald, K.M. Ross, I. Garthwaite, N.R. Towers, Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of yessotoxin and its analogues, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5836–5842.
- [18] A. Alfonso, L. de la Rosa, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity: effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 193–208.
- [19] M.J. Pazos, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, J.M. Vieites, L.M. Botana, Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions, *Anal. Biochem.* 335 (2004) 112–118.
- [20] M.F. Perrin, Polarisation de la lumière de fluorescence: Vie moyenne des molécules dans l'état excité, *Le Journal de physique et le radium* 7 (1926) 390–401.
- [21] *Fluorescence Polarization: Technical Resource Guide*, PanVera Corporation, Madison, WI, 2002.
- [22] E.A. Sar, M.E. Ferrario, B. Reguera, Floraciones algales nocivas en el cono sur americano, *Instituto Español de Oceanografía* (2002).
- [23] M.R. Vieytes, O.I. Fontal, F. Leira, J.M. Baptista de Sousa, L.M. Botana, A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins, *Anal. Biochem.* 248 (1997) 258–264.
- [24] A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 93–99.
- [25] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999.
- [26] M.J. Pazos, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, Kinetic analysis of the interaction between yessotoxin and analogs and immobilized phosphodiesterases using a resonant mirror optical biosensor, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1155–1160.
- [27] A. Murakami, M. Nakaura, Y. Nakatsuji, S. Nagahara, Q. Tran-Cong, K. Makino, Fluorescent-labeled oligonucleotide probes: detection of hybrid formation in solution by fluorescence polarization spectroscopy, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4097–4102.
- [28] D.M. Jameson, E. Gratton, J.F. Eccleston, Intrinsic fluorescence of elongation factor Tu in its complexes with GDP and elongation factor Ts, *Biochemistry* 26 (1987) 3894–3901.
- [29] I. Nazarenko, R. Pires, B. Lowe, M. Obaidy, A. Rashtchian, Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2089–2195.
- [30] D.M. Jameson, W.H. Sawyer, Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions, *Methods Enzymol.* 246 (1995) 283–300.

**I.2. Extraction and cleaning methods to detect yessotoxins in  
contaminated mussels.**



Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Analytical Biochemistry 363 (2007) 228–238

ANALYTICAL  
BIOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/yabio

## Extraction and cleaning methods to detect yessotoxins in contaminated mussels

C. Alfonso <sup>a</sup>, A. Alfonso <sup>a</sup>, M.J. Pazos <sup>a,e</sup>, M.R. Vieytes <sup>b</sup>, T. Yasumoto <sup>c</sup>, A. Milandri <sup>d</sup>,  
R. Poletti <sup>d</sup>, L.M. Botana <sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago, 27002 Lugo, Spain

<sup>b</sup> Departamento Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago, 27002 Lugo, Spain

<sup>c</sup> Japan Food Research Laboratories, Tama, Tokyo 206-0025, Japan

<sup>d</sup> Centro Ricerche Marine, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, 47042 Cesenatico, Italy

<sup>e</sup> Área de Apoyo a Investigación Agrobiológica, Servicios Xerales, USC, 27002 Lugo, Spain

<sup>f</sup> EU-Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Agencia Española Seguridad Alimentaria, Estación Marítima s/n, 36200 Vigo, Spain

Received 24 October 2006

Available online 19 January 2007

### Abstract

Yessotoxin (YTX) and its analogues are a newly recognized group of toxins with increased presence in shellfish in recent years. They can be quantified by various functional assays due to their interaction with phosphodiesterases (PDEs). One of these assays detects the binding between the YTX and the fluorescently labeled PDE I using fluorescence polarization, a spectroscopic technique based on exciting a fluorescent molecule with plane-polarized light and measuring the polarization degree of the emitted light. The aim of this study was to develop a YTX extraction procedure from mussels that does not interfere with this detection method. YTX concentrations were measured in spiked mussel extracts obtained through use of different extraction methods and cleaning procedures. The percentages of toxin recovery in various steps of the processes were calculated using these concentrations. Six extraction methods and two cleaning steps were used and no matrix effects and high toxin recoveries were obtained in two cases. One case used acetone as extraction solvent followed by three dichloromethane partitions and the other case used methanol. The cleaning procedure includes a silica cartridge and a 10,000 NMWL filter. Finally these two extraction–cleaning–detection methods were applied to a naturally contaminated mussel sample and results showed that not only YTX but also homoYTX and hydroxyYTX can be quantified with a 85–90% recovery.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Yessotoxins; Phosphodiesterases; Detection; Cleaning procedures; Extraction methods; Fluorescence polarization

Yessotoxin (YTX)<sup>1</sup> is a polycyclic ether toxin originally isolated from the digestive glands of the scallop *Patinopecten yessoensis* during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Japan [1]. This toxin is produced by the dinofla-

gellates *Protoceratium reticulatum* [2] and *Lingulodinium polyedrum* [3] and can be accumulated by filter-feeding shellfish. Different YTX analogs in microalgae and shellfish, such as trinorYTX and 45-hydroxyYTX [4], homoYTX and its 45-hydroxylated derivative [5], adriatoxin [6], desulfoYTX [7] and carboxyYTX [8] have been identified. Also, some analogs with one or more pentose units as side chains have been described [9,10] and analysis recently done with LC-MS indicate that there are more than 90 YTX analogs, some with unknown structure [11].

YTX and its analogs (YTXs) were initially classified as DSP toxins because they were extracted from shellfish together with okadaic acid and dinophysistoxins [1]. Later

\* Corresponding author. Fax: +34 982 252 242.

E-mail address: Luis.Botana@lugo.usc.es (L.M. Botana).

<sup>1</sup> Abbreviations used: YTX, yessotoxin; DSP, diarrhetic shellfish poisoning; PDEs, Phosphodiesterases; FP, fluorescence polarization; F.U., fluorescence units; NMWL, nominal molecular weight limit; DMSO, dimethyl sulfoxide; mP, millipolarization units; PBS, phosphate-buffered saline; FAM, succinimidyl-ester of carboxy-fluorescein; PDE I-F, phosphodiesterase I-FAM conjugates; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

studies have shown that YTXs must be considered a distinct group of marine toxins because they do not produce diarrhea and both the mechanisms of action and the biogenetic origins are different from those of DSP toxins [12,13]. The presence of this newly recognized class of toxins in shellfish has increased in recent years as has its geographical distribution, with toxic episodes in Japan, Norway, Chile, Italy, and New Zealand [14].

Toxicological and pharmacological behavior of YTX is being investigated. Its intraperitoneal (i.p.) injection showed high mouse lethality, whereas its oral administration did not kill mice even at high doses [12]. Some authors indicated the heart as the target organ after YTX i.p. administration [15], whereas others suggested that YTX might be implicated in neurological disorders and its principal target could be the thymus [16]. In human lymphocytes YTX induced an increase in cytosolic calcium concentration [17] and an activation of phosphodiesterases (PDEs) activity [13]. Using an optical biosensor, it was found that there is binding between PDEs and YTX [18]. This was later confirmed by fluorescence polarization (FP) [19]. The binding depends on the YTX structure and the PDE enzyme family [20,21]. All these results implicate PDEs as intracellular targets for YTXs.

The existence of YTXs in shellfish samples has toxicological implications. The method in use to detect them is the original mouse bioassay [22] or one of its modifications [23,24]. This bioassay has some disadvantages such as lack of accuracy and specificity, generation of false-positive and false-negative results, and existence of ethical concerns (current European legislation sets a limit of 1 mg/kg flesh [25]). In addition, the existence of YTX in shellfish samples can generate false-positive results in the mouse bioassay used to detect DSP toxins. YTX concentration in a sample can be determined by different methods such as HPLC with fluorimetric detection [26,27], LC-MS [28], enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [29], and functional assays based on the effect of YTX in MCF-7 cells [30]. But YTX concentration also can be determined by measuring the PDEs activation [31] or by detecting the binding between these enzymes and the toxin using an optical biosensor [18] or fluorescence polarization [19]. A critical step in applying all these methods in routine shellfish control is the extraction procedure used because the extracts should retain all the YTXs of the shellfish without matrix effect.

Fluorescence polarization is a spectroscopic technique [32] based on exciting a fluorescent molecule with plane-polarized light and measuring the polarization degree of the emitted light [33]. An important application of this technique is the study of molecular interactions because the FP value of a molecule will be different if binding with another molecule occurs [19].

The aim of this work was to select a method to extract YTXs with minimum matrix effect. We studied different extraction methods used to measure YTX concentrations in shellfish samples. We contaminated the extracts in differ-

ent steps of the processes and determined the percentages of toxin recovery in each case using the FP technique.

## Materials and methods

### Chemicals

YTX was purified by T. Yasumoto; a 300  $\mu$ M (approximately) yessotoxin solution in methanol was also used. Phosphodiesterase I (PDE I; Type IV from *Crotalus atrox*; EC 3.1.4.1) was obtained from Sigma (Spain). Fluoro-Spin 498 protein labeling and purification kit was purchased from empBiotech GmbH (Germany).

Acetone and chloroform were obtained from Merck (Spain), methanol was purchased from Panreac (Spain), and dichloromethane and *n*-hexane were obtained from Prolabo (Spain). Silica sep-cartridges (600 mg) were purchased from Lida Manufacturing Corp. (Spain), and Microcon YM-30 filters (30000 nominal molecular weight limit (NMWL) with cellulose membrane) and Ultrafree-CL filters (10,000 NMWL with low-binding regenerated cellulose membrane) were obtained from Millipore (Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma.

The composition of the saline solution phosphate-buffered saline (PBS), used in the experiments was 137 mM NaCl, 8.2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 3.2 mM KCl, and its final pH was adjusted to 7.4 using NaOH. All these chemicals were purchased from Panreac except  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  which was obtained from Merck.

### Protein labeling

A reactive succinimidyl-ester of carboxy-fluorescein (FAM) is used to label PDE I. When this dye reacts with an amine group of a protein it forms a covalent amide linkage. The resultant protein-dye conjugates have absorption and fluorescence emission maxima at 495–499 and 518–523 nm, respectively. The kit contains all the chemicals and tools used during the labeling and purification processes.

The protein (10 mg/ml) is mixed with a sodium bicarbonate solution (free of ammonium anions or primary amines), the dye is added, and then the mixture reacts for 1 h at room temperature protected from light. Afterward, a hydroxylamine solution is added to stop the labeling and the mixture reacts for 30 min.

The purification process consists of isolating the protein-dye conjugates using spin columns. Then the conjugates, called PDE I-F, can be stored for a long time at  $-20^\circ\text{C}$  (at least 2 months) in aliquots protected from light.

### Fluorescence polarization

The Plate Chameleon instrument from Hidex (Finland) was used to measure the fluorescence intensity and the FP. Measurements were done in black polystyrene 96 microwell plates from Costar (Spain).



The light source was a xenon flash lamp with a closed loop intensity control. The detectors were photomultipliers and photodiodes, and filters and polarization filters (for FP) were used to select the desired wavelengths. In this case the filters of 485 nm for excitation and 535 nm for emission were used to measure the fluorescence intensity, and the polarization filters of the same wavelengths were used to measure the FP units. The results can be downloaded to the Hidex Data Analysis software or to Excel. Before measuring, the plates were shaken in a temperature-controlled horizontal shaker (Thermostar; BMG LabTechnologies, Germany).

The fluorescence intensity can be measured after setting a value for the gain so that the obtained readings were between 10 and 200,000 fluorescence units (F.U.). The polarization degree of the emitted light (measured in millipolarizations units, mP) is calculated by the equation

$$\text{mP} = 1000 \left[ \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \right],$$

where  $I_{\parallel}$  is the fluorescence intensity measured with vertical excitation and vertical emission polarization filters (parallel intensity),  $I_{\perp}$  is the fluorescence intensity measured with vertical excitation and horizontal emission polarization filters (perpendicular intensity), and  $G$  is a correction factor used because the optical components of the instrument affect the beam of light depending on its polarization plane.  $G$  is determined by measuring a dilution series of the dye with an FP protocol and modifying  $G$  until the mP values obtained are between 20 and 30.

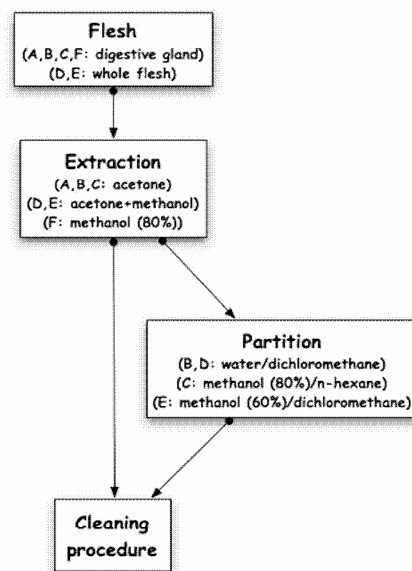
#### Mussel samples processing

Uncontaminated mussels bought in the local market were opened and the meat and the digestive glands were collected in two piles and homogenized. Six methods were used to obtain the mussel extracts (see Scheme 1).

**Method A.** Homogenate from the digestive glands was extracted thrice with acetone. Each extract was filtered by vacuum and the three extracts were mixed and vacuum dried [34].

**Method B.** Homogenate from the digestive glands was extracted thrice with acetone. Each time the extract was filtered by vacuum and the three extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was diluted in water and extracted thrice with dichloromethane. The three organic phases were mixed and extracted twice with water and the final organic phase was vacuum dried [23].

**Method C.** Homogenate from the digestive glands was extracted thrice with acetone. Each extract was filtered by vacuum and the three extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was resuspended in 80% methanol and extracted twice with *n*-hexane. The final methanolic layer was evaporated to dryness [35].



Scheme 1. Extraction methods to detect YTX in mussels.

**Method D.** Homogenate from the mussel meat was extracted with acetone. The meat extract was filtered by vacuum and extracted again with methanol. Acetone and methanol extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was diluted in water and extracted twice with dichloromethane. The two organic layers were mixed and vacuum dried [36].

**Method E.** Homogenate from the mussel meat was extracted with acetone. The meat extract was filtered by vacuum and extracted again with methanol. Acetone and methanol extracts were mixed and vacuum dried. The dried extract was diluted in dichloromethane and extracted thrice with 60% methanol. The three methanolic layers were mixed and evaporated to dryness [36].

**Method F.** Homogenate from the digestive glands was extracted with 80% methanol [37]. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at 4 °C, the supernatant was collected and evaporated to dryness.

#### Cleaning procedure

Dried extracts obtained were dissolved with chloroform-methanol (9:1) and charged to a silica cartridge in a vacuum system (VAC ELUT SPS 24; Varian, USA). The cartridge was washed with the same solvent and then eluted with chloroform-methanol (4:6) [38]. This final extract was evaporated to dryness with a stream of  $N_2$ .

Afterwards it was dissolved in PBS (with less than 1% DMSO) and filtered using a 10,000-NMWL filter [19].

#### Data analysis

All experiments were carried out at least three times using duplicates. Data were normalized and results were expressed as means  $\pm$  SE. Results were analyzed using the Student *t* test or analysis of variance (ANOVA). A probability level of 0.05 or less was used for statistical significance.

#### Results

The interaction between YTX and PDEs has been used to design new toxin detection methods [18,31]. In a previous study [19] we applied the FP technique to elucidate this interaction. It was found that FP of PDE I-F decreased with increasing YTX concentration in the medium and this relationship could be used to calculate the amount of YTX in a sample with unknown concentration. It was demonstrated that this technique was suitable for detection of YTX in PBS media and that some YTX extraction procedures used for mussels did not show matrix effects with FP [19]. Here we describe a complete study of different YTX extraction methods used for spiked mussels, the toxin recovery for each method and the application to a naturally contaminated mussel sample.

Initially, the PDE I was labeled and the final conjugate (PDE I-F) was dissolved in PBS buffer. The obtained degree of labeling was 0.8 molecule of dye per molecule of protein. To select the correct dilution factor to perform the experiments and their volume, the FP of a dilution series of the protein stock solution was measured (data not shown). From that, the selected dilution factor was 1:5000 and the PDE I-F concentration remained constant in all experiments.

We were looking for a YTX extraction procedure that did not interfere with the FP technique but provided a high toxin recovery. Initially, we applied the six extraction methods under materials and methods described (A, B, C, D, E, and F) without any cleaning step. To achieve this, dried extracts from these methods (toxin-free) were dissolved in PBS (with less than 1% DMSO) and the fluorescence intensity of each extract was measured and compared with the fluorescence of PBS buffer (Fig. 1A). Results showed that methods A, C, E, and F could not be directly applied because the extracts contained one or more fluorescent molecules that could interfere with the FP of PDE I-F (fluorescence intensities of these extracts are higher than 30,000 F.U.). Extracts from methods B and D were less fluorescent (1300 and 4700 F.U., respectively) but had fluorescence values above those of PBS buffer (600 F.U.). We also measured the FP of PDE I-F in these extracts spiked with 2.5  $\mu$ M YTX and without the toxin. The FP values of the PDE I-F conjugate should be the same in the mussel extract and in PBS buffer, but these FP values should have

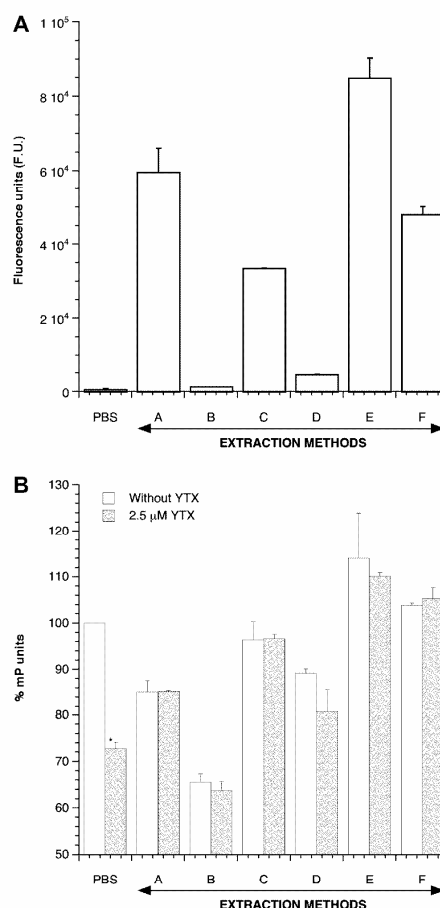


Fig. 1. (A) Fluorescence intensity of various mussel extracts. Shellfish samples were extracted using six different methods: A, B, C, D, E, and F. Fluorescence intensities of the six extracts dissolved in PBS (with less than 1% DMSO) were measured and compared with fluorescence intensity of PBS buffer. Fluorescence intensity was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. (B) YTX effect over FP units (mP) of PDE I-F conjugate in various mussel extracts. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to the six different shellfish extracts, uncontaminated and contaminated with 2.5  $\mu$ M YTX. Data were expressed as % of response in relation to the control response (obtained in PBS buffer without YTX). FP was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. \* Significant differences between uncontaminated medium and 2.5  $\mu$ M YTX contaminated medium using the same extraction procedure.

measurable differences from those obtained when YTX is present in the mussel extract. Results are plotted in Fig. 1B as percentage of mP units of PDE I-F in each

medium with respect to mP units of PDE I-F in PBS buffer without toxin. As shown, FP values obtained with and without YTX were not statistically different in any mussel extract, only PBS values were different. Therefore these extraction matrices cannot be used in this form to detect YTX by FP.

After this initial attempt, we knew that the obtained extracts needed to be cleaned to remove the fluorescence. First, we used a 30,000-NMWL filter (data not shown). Results were similar to those shown before; the fluorescence intensity was similar or even higher due to the absorption of a residual volume of solvent in the cellulose membrane of the filter. Second, we used a silica cartridge to clean the extracts (data not shown). In this case the fluorescence intensity diminished but in each extract the fluores-

cence polarization units (mP values) with and without YTX were again very similar.

After these initial failed attempts we decided to apply to the extraction media a cleaning procedure with two steps: a silica cartridge followed by a 10,000-NMWL filter. Fig. 2 shows the results obtained using this cleaning procedure with methods A, B, D, and F and PBS as control with and without 2  $\mu$ M YTX. As shown in Figs. 2A and C, for extraction methods A and D there were no significant differences between contaminated and uncontaminated samples, while for the PBS control these differences were significant. However, when B or F extraction methods were used, (Figs. 2B and D) there were statistically significant differences when YTX was present with regard to uncontaminated media, in a fashion similar to that with the

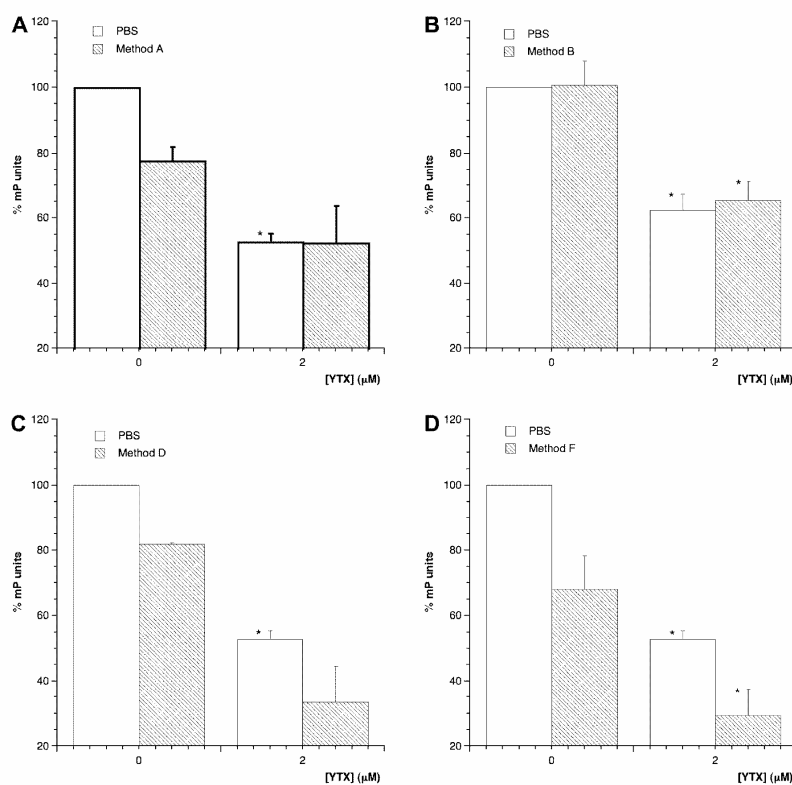


Fig. 2. Effect of YTX on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts using different extraction procedures. A constant amount of PDE I-F conjugate was added to four shellfish extracts obtained using different extraction methods followed by a common two-step cleaning procedure. The extracts were uncontaminated or contaminated with 2  $\mu$ M YTX. Data are expressed as % of response in relation to the control response (obtained in PBS buffer without YTX). FP was measured after 5 min incubation. (A) Extraction method A, (B) extraction method B, (C) extraction method D, (D) extraction method F. Mean  $\pm$  SE of three experiments. \* Significant differences between uncontaminated medium and 2  $\mu$ M YTX contaminated medium using the same extraction procedure.

PBS control. Therefore, these last two extraction methods in conjunction with the cleaning procedure can be used to detect YTX by FP.

Then we tried to modify the cleaning procedure to determine whether the two steps and the order in which they were performed were important. We selected method F and the results are shown in Fig. 3. First, we used only the 10,000-NMWL filter, and results appear in Fig. 3A. The obtained extract is fluorescent and shows a higher signal than PDE I-F dissolved in PBS buffer (310,000 F.U. versus 60000 FU.); therefore this option cannot be applied. Second, we inverted the order of the two steps, with the 10,000-NMWL filter followed by the silica cartridge, as shown in Figs. 3B and C. The fluorescence intensity (Fig. 3B) is higher in the F extract than in PBS buffer, but this signal is lower than the fluorescence of PDE I-F dissolved in PBS buffer. Nevertheless, Fig. 3C shows that mP units of PDE I-F in the extract are statistically different from mP units of this labeled protein in PBS buffer, in presence and absence of YTX. Moreover, mP units in the extract do not change with and without YTX. Therefore, these results show that the cleaning procedure must include the two steps in a predetermined order: silica cartridge followed by 10,000-NMWL filter.

Once we had established the correct cleaning procedure, we performed toxin recovery studies in different steps of some extraction procedures. We chose methods B and F (since the obtained extracts were suitable, Fig. 2), A (the extraction procedure often used in mouse bioassays), and E (one of the methods for whole flesh), all followed by the two cleaning steps described above. To study the percentage of toxin recovery, we obtained different extracts with each method and contaminated each extract in one

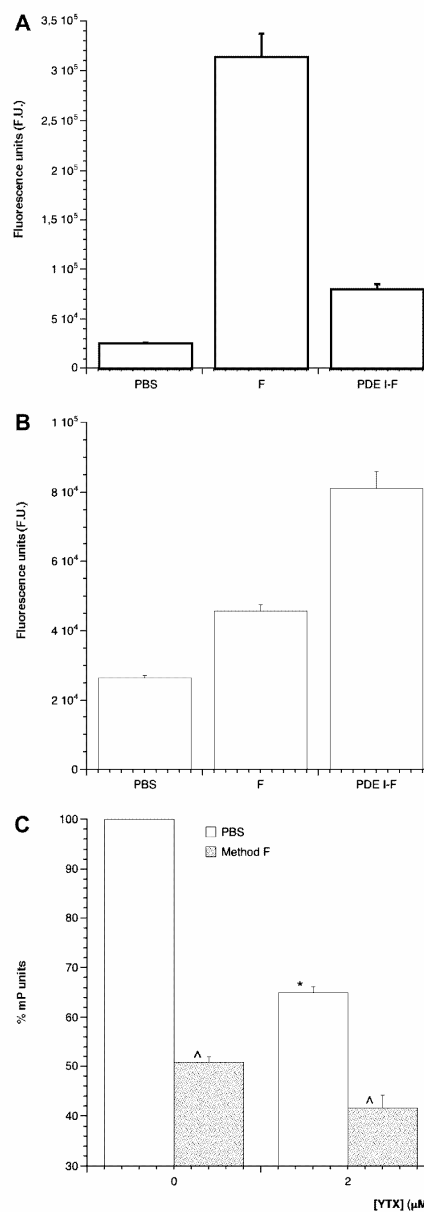
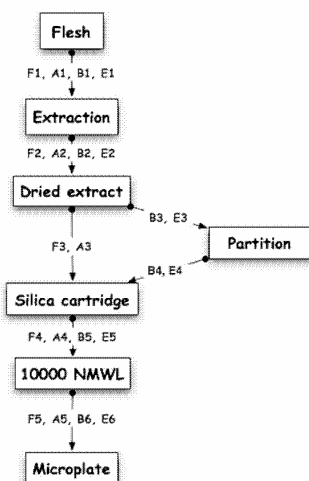


Fig. 3. Effect of variations in the cleaning procedure on fluorescence of the extract using method F. (A) Fluorescence intensity of the extract using method F with only the 10,000-NMWL filter. Fluorescence intensity of the extract using method F was measured, using as cleaning procedure only the 10,000-NMWL filter. This value was compared with fluorescence intensity of PBS buffer and with fluorescence intensity of the constant amount of PDE I-F conjugate used dissolved in that buffer. Fluorescence intensity was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. (B) Fluorescence intensity of the extract using method F with first the 10,000-NMWL filter and second the silica cartridge. Fluorescence intensity of the extract using method F was measured, using as cleaning procedure the 10,000-NMWL filter followed by the silica cartridge. This value was compared with fluorescence intensity of PBS buffer and with fluorescence intensity of the constant amount of PDE I-F conjugate used dissolved in that buffer. Fluorescence intensity was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. (C) YTX effect on FP units (mP) of PDE I-F conjugate in mussel extracts using method F with first the 10,000-NMWL filter and later on the silica cartridge. FP units of PDE I-F conjugate were measured in uncontaminated and contaminated with 2  $\mu$ M YTX extracts from method F using the inverted cleaning procedure. Data are expressed as % of response in relation to the control response (obtained in PBS buffer without YTX). FP was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. <sup>^</sup> Significant differences between F extract and PBS buffer. \* Significant differences between uncontaminated medium and 2  $\mu$ M YTX contaminated medium.



A through F: methods  
1 through 6: contamination points (one contamination per protocol)

Scheme 2. Contamination points used to study the percentage of toxin recovery. Each contamination point is shown with the extraction method (F, A, B, or E) and one number (from 1 to 6).

of the steps of the method with a constant and known YTX amount (see Scheme 2).

First we tested method F. The contaminated steps in this extraction method were the digestive glands (point 1; P1), the supernatant (point 2; P2), the chloroform-methanol extract before the silica cartridge (point 3, P3), the PBS-DMSO solution before the 10,000-NMWL filter (point 4; P4), and the final extract in the microplate (point 5; P5). The FP of PDE I-F in each extract was measured and

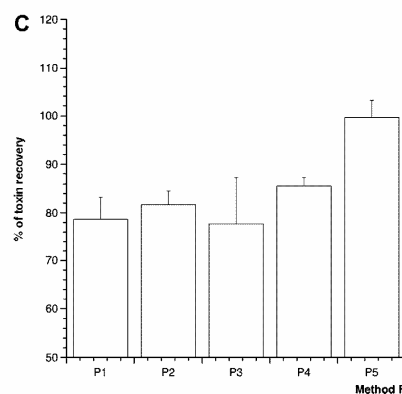
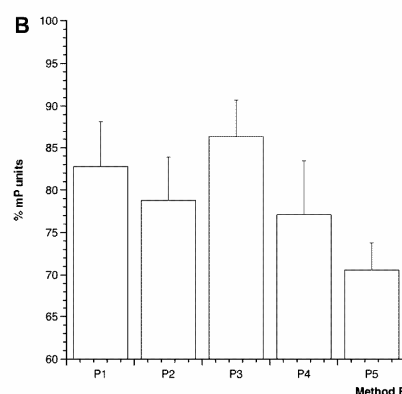
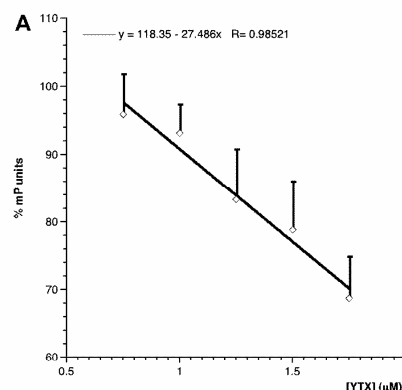


Fig. 4. (A) Variations in FP units (mP) of PDE I-F conjugate induced by different YTX concentrations. Different concentrations of YTX were added over a constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate in PBS media. Data are expressed as % of response in relation to the control response (obtained in PBS buffer without YTX) and fitted as a linear regression. FP was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. (B) Variations in FP units (mP) of PDE I-F conjugate induced by different unknown YTX concentrations. A constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate was added to five mussel extracts obtained using method F and the cleaning procedure. Each extract was contaminated in one step of the method (1, 2, 3, 4 or 5) with a constant amount of YTX. Data are expressed as % of response in relation to the control response (obtained in PBS buffer without YTX). FP was measured after 5 min incubation. Mean  $\pm$  SE of three experiments. (C) Percentages of toxin recovery in different steps of the method F and the cleaning procedure. The % of toxin recovery in each contaminated point of the method (1, 2, 3, 4, or 5) was calculated using the data from B, the equation of the straight line plotted in A, and the constant amount of YTX utilized to contaminate the extracts. Mean  $\pm$  SE of three experiments.

expressed as percentage of mP units (Fig. 4B, where 100% mP units corresponds to PDE I-F in uncontaminated PBS medium). To convert these percentages of mP units in YTX concentrations, a calibration curve with different YTX concentrations was obtained by measuring the FP of PDE I-F in contaminated PBS media (Fig. 4A). Finally, the percentage of toxin recovery in each contaminated point was calculated using the obtained YTX concentrations and the known YTX amount initially added. These percentages appear in Fig. 4C, which shows the average of three different extractions. The percentage of recovery is similar in all the points, around 80%, except in point 5, which shows approximately 100% recovery. In addition, the FP of the PDE I-F in PBS buffer is similar to the FP of the PDE I-F in an uncontaminated extract obtained using method F and the cleaning procedure (data not shown and data in Fig. 2D). Therefore, no matrix effect is observed with method F.

Second we tested method A. Contamination points 1, 3, 4, and 5 were the same as those for in method F. P2 corresponded to the mixed acetone extract. Following the procedure described for method F, we calculated the percentage of toxin recovery (Fig. 5). When the contamination is done in the first step of the procedure (the digestive glands) the percentage of recovery is smaller (60%) than that in the last step, so it seems that there is a toxin loss in each step of method A. However, the uncontaminated extract obtained with this method presents matrix effect (data not shown and data in Fig. 2A), so extraction procedure A must not be used.

Third, we tested method B with the following contamination points (six): the digestive glands (P1), the mixed acetone extract (P2), the dichloromethane–water extract before partition (P3), the chloroform–methanol extract before the silica cartridge (P4), the PBS–DMSO solution before the 10,000-NMWL filter (P5), and the final extract in the microplate (P6). Percentages of toxin recovery are again very similar for all contamination points (Fig. 6), approximately 85–90%, except for the extract contaminated in the microplate. In this case no matrix effect was observed when the FP of PDE I-F in an uncontaminated extract was measured (data not shown and data in Fig. 2B), therefore method B seems to be a suitable extraction procedure.

Finally, we tested method E. P4, P5, and P6 are the same as in method B; P1 is the whole shellfish flesh, P2 is the acetone–methanol extract and P3 is the dichloromethane–methanol extract before partition. Fig. 7 shows that the percentage of toxin recovery is 85–90% for points 2, 3, 4, and 5, whereas for P1 it is a bit smaller (78%) and for P6 quite higher (119%). With this method the standard deviation of the percentages is higher than that with the previous method and matrix effect is observed (data not shown).

In summary, methods B and F are suitable extraction procedures because they have a high and stable percentage of toxin recovery. However, methods A and E show matrix effect and their use with fluorescence polarization is not recommended.

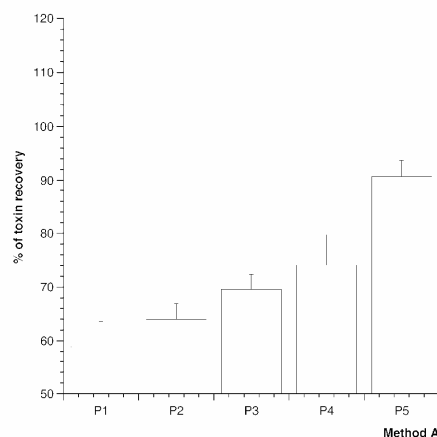


Fig. 5. Percentages of toxin recovery in different steps of method A used with the cleaning procedure. A constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate was added to five mussel extracts obtained using method A with the cleaning procedure. Each extract was contaminated in one step of the method (1, 2, 3, 4, or 5) with a constant amount of YTX. FP was measured after 5 min incubation. The % of toxin recovery in each extract was calculated following the same procedure as that for method F. Mean  $\pm$  SE of three experiments.

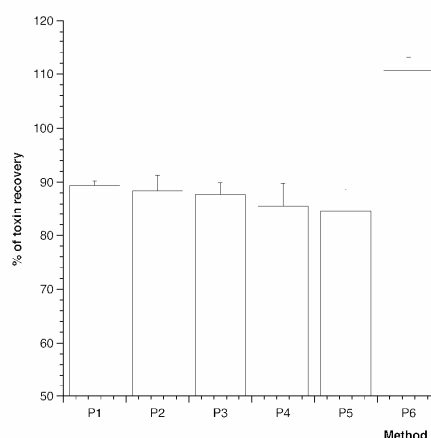


Fig. 6. Percentages of toxin recovery in different steps of method B used with the cleaning procedure. A constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate was added to six mussel extracts obtained using method B with the cleaning procedure. Each extract was contaminated in one step of the method (1, 2, 3, 4, 5, or 6) with a constant amount of YTX. FP was measured after 5 min incubation. The % of toxin recovery in each extract was calculated following the same procedures that for method F. Mean  $\pm$  SE of three experiments.

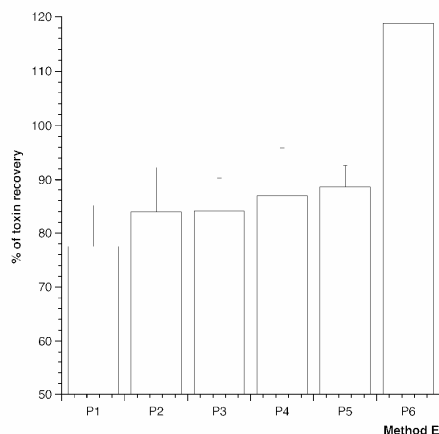


Fig. 7. Percentages of toxin recovery in different steps of method E used with the cleaning procedure. A constant amount of fluorescent PDE I-F conjugate was added to six mussel extracts obtained using method E with the cleaning procedure. Each extract was contaminated in one step of the method (1, 2, 3, 4, 5, or 6) with a constant amount of YTX. FP was measured after 5 min incubation. The % of toxin recovery in each extract was calculated following the same procedure as that for method F. Mean  $\pm$  SE of three experiments.

After that we quantified with our extraction, cleaning, and detection methods the amount of YTXs in a naturally contaminated mussel sample collected in a toxic episode on the Italian coast. The YTXs concentration of this sample had been determined by LC-MS as 0.236  $\mu$ g of YTX, 0.947  $\mu$ g of homoYTX, and 0.384  $\mu$ g of hydroxyYTX per gram of sample. We did three extractions with each method (B and F) and measured the amount of YTXs by fluorescence polarization. The theoretical quantity of YTXs in 2 g of sample was 3.134  $\mu$ g and the measured amounts by FP were  $2.825 \pm 0.200 \mu$ g for method B and  $2.657 \pm 0.032 \mu$ g for method F. The percentages of recovery were 90 and 85%, respectively. As shown in Table 1, these values are very similar to the percentages of recovery obtained for P1 contamination using each extraction method. Therefore, the YTXs concentration in a sample can be quantified using FP and extraction procedures B

Table 1  
YTXs amount measured in naturally contaminated mussel samples

	YTXs ( $\mu$ g)	% Recovery	% Recovery in P1
Method B	$2.83 \pm 0.20$	$90.2 \pm 6.4$	$89.4 \pm 0.8$
Method F	$2.66 \pm 0.03$	$84.8 \pm 1.0$	$78.7 \pm 4.6$

Naturally contaminated mussel samples were extracted following methods B and F and the two steps cleaning procedure previously described and later their YTXs amounts were measured by FP. Each sample contained 3.134  $\mu$ g YTXs (data from LC-MS). The percentage of toxin recovery was calculated for each method and compared with the percentage of toxin recovery in P1 (previously obtained with spiked mussel samples, data from Figs. 6 and 4C). Mean  $\pm$  SE of three experiments.

or F and applying the percentage of toxin recovery previously calculated for the first contamination point of each method.

The performance of all these methods was also studied using the resonant mirror detection method [18]. Of all the protocols, method B was found to provide the best results with this technology (results not shown).

### Discussion

The presence of marine toxins in seafood products is an important area of investigation, principally due to human health problems after consumption of contaminated shellfish. This investigation has generated the isolation and purification of various newly recognized groups of toxins and the discovery of the mechanism of action of some of them. Nowadays detection methods for all these new toxins are being sought.

YTX and its analogues are one of these new groups of marine toxins with a wide geographical extension in recent years [14]. There are some methods that can be used to detect them, such as mouse bioassay [22–24], ELISA [29,39], instrumental methods based on liquid chromatography and/or mass spectrometry [1,11,26,40], and functional assays [18,19,30,31]. A necessary step with all these methods is to obtain an extract from the shellfish sample, which must contain all the YTXs and not interfere with the detection method. This can be done following several different extraction procedures with different advantages and detriments.

The extracts can be obtained from the digestive glands or the whole flesh of shellfish; some authors have said that YTXs are stored in the digestive glands of certain mussel species (*Mytilus galloprovincialis* and *Perna canaliculus*) [41], whereas others have localized them in immunocytes and digestive glands of *M. galloprovincialis* [42]. Usually sample extraction begins with acetone [22] due to the lipophilic nature of these toxins and the ease of evaporating this solvent, despite the fact that acetone extracts are very complex and contain impurities, such as fats and other non polar lipids [43]. Later this extract can follow different separation procedures, with certain solvents (dichloromethane, hexane) and proportions [23,35], to obtain a final clean extract. There are other extraction methods that begin with aqueous methanol, providing an extract with fewer lipids than the preceding methods [44], or with a double extraction with acetone and aqueous methanol [36]. The final extract can be cleaned using other procedures such as filters, silica or alumina columns, and solid-phase extraction cartridges, before the measurement with the chosen detection method [43]. The problem with these extraction procedures is that all described steps can produce toxin losses, which must be calculated to determine the toxin concentration in the original sample.

In this paper we describe for the first time the toxin recovery obtained with some extraction procedures using fluorescence polarization. This is a useful technology to

detect the binding between molecules if one molecule is fluorescent. In this case we label PDE I with a fluorescent dye (PDE I-F) and measure the fluorescence polarization of the conjugate in different media. In a previous article [19] we showed that the FP of PDE I-F decreases in a concentration-dependent fashion when YTX binds to it. Comparing with other studies [45–47], we suggested that the binding between the YTX and the labeled PDE I produces an increase in the local motion of the dye and, thus, a decrease in its FP. Moreover, in this case local motion is important because it is a covalent probe [48]. With these results we described a method to detect YTX in contaminated samples [19]. This method is easy and economical and has a high degree of repeatability. The FP avoids the ethical problems of the official mouse bioassay and the false-positive and false-negative results. In addition, this method is as accurate as LC–MS but less expensive and complex in technology and presents a high repeatability. Another positive consideration with regard to FP method is that, since it is a functional assay and uses a YTX target, it detects different YTX analogs without the need of specific standards (which LC–MS does need).

In the present study, we used six extraction methods previously described and various cleaning steps to eliminate the matrix effect in FP. After some tests we established that the cleaning procedure must include two steps: a silica cartridge followed by a 10,000-NMWL filter. Finally, we calculated the percentage of toxin recovery after contamination of the extracts in several steps of the procedures, using four extraction methods (A, B, E, and F). These tests show that some extracts have matrix effect despite the cleaning procedure. The problems are probably due to the use of an acetone complex extract without partitions in method A and the whole flesh shellfish in method E. However, extracts from methods F and B with the cleaning procedure do not show matrix effects and the percentages of toxin recovery in various steps are high, stable, and reproducible, therefore they are extraction methods suitable for quantifying YTX in mussel samples. Choosing between them is difficult because, whereas B is work-intensive and uses chlorinated solvents, F shows a smaller percentage of toxin recovery.

To complete the study we used these methods (B and F) to quantify YTXs concentration in a naturally contaminated mussel sample, which contains YTX, homoYTX, and hydroxyYTX (previously determined by LC–MS). The percentages of toxin recovery in this sample are similar to the percentages in the spiked extracts previously utilized. So, the extraction and cleaning procedures described can be used to quantify YTX, homoYTX, and hydroxyYTX, in mussel samples with a high degree of accuracy, applying the calculated percentage of toxin recovery. Moreover, these tests show that the FP method can be used to quantify these two YTX analogues, which had not been demonstrated until now.

In summary, in this study we compared different methods to extract YTXs from mussel samples and clean the

extracts. We use spiked samples and naturally contaminated samples and determined YTXs concentration by fluorescence polarization. Finally we designed two mixed procedures (for extraction, cleaning, and detection) that can be applied to the routine analysis of shellfish samples.

#### Acknowledgments

Carmen Alfonso was funded with Fellowship MEC AP-2004-5731. This work was funded by the following grants: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Grant Nos.: SAF2003-08765-C03-02, REN2001-2959-C04-03, REN2003-06598-C02-01, AGL2004-08268-02-02/ALI and AGL2006-08439/ALI); Xunta de Galicia, Spain (Grant Nos. PGIDT99INN26101, PGIDIT03AL26101PR, and PGIDIT04TAL261005PR); Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain (Grant Nos. FISS PI050323); EU VIth Frame Program (Grant Nos. IP FOOD-CT-2004-06988 (BIOCOP), and STREP FOOD-CT-2004-514055 (DETECTOX), and CRP 030270-2 (SPIES-DETOX).

#### References

- [1] M. Murata, M. Kumagai, J. Soo Lee, T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5869–5872.
- [2] M. Satake, L. MacKenzie, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 5 (1997) 164–167.
- [3] R. Draisci, E. Ferretti, L. Palleschi, C. Marchiafava, R. Poletti, A. Milandri, A. Ceredi, M. Pompei, *Toxicon* 37 (1999) 1187–1193.
- [4] M. Satake, K. Terasawa, Y. Kadowaki, T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 5955–5958.
- [5] M. Satake, A. Tubaro, J.S. Lee, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 5 (1997) 107–110.
- [6] P. Ciminiello, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, R. Poletti, R. Viviani, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 8897–8900.
- [7] M. Daiguji, M. Satake, H. Ramstad, T. Aune, H. Naoki, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 6 (1998) 235–239.
- [8] P. Ciminiello, E. Fattorusso, M. Forino, R. Poletti, R. Viviani, *Eur. J. Org. Chem.* 2000 (2000) 291–295.
- [9] M.L. Souto, J.J. Fernandez, J.M. Franco, B. Paz, L.V. Gil, M. Norte, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 420–422.
- [10] M. Konishi, X. Yang, B. Li, C.R. Fairchild, Y. Shimizu, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 1309–1313.
- [11] C.O. Miles, I.A. Samdal, J. Aasen, D.J. Jensen, M.A. Quilliam, D. Petersen, L.M. Briggs, A.L. Wilkins, F. Rise, J.M. Cooney, A.L. MacKenzie, *Harmful Algae* 4 (2005) 1075–1091.
- [12] H. Ogino, M. Kumagai, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 5 (1997) 255–259.
- [13] A. Alfonso, L. de la Rosa, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 193–208.
- [14] R. Draisci, L. Lucentini, A. Mascioli, in: L.M. Botana (Ed.), *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, pp. 289–324.
- [15] K. Terao, E. Ito, M. Oarada, M. Murata, T. Yasumoto, *Toxicon* 28 (1990) 1095–1104.
- [16] A. Franchini, E. Marchesini, R. Poletti, E. Ottaviani, *Toxicon* 43 (2004) 347–352.
- [17] L.A. de la Rosa, A. Alfonso, N. Vilarino, M.R. Vieytes, L.M. Botana, *Biochem. Pharmacol.* 61 (2001) 827–833.
- [18] M.J. Pazos, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, J.M. Vieites, L.M. Botana, *Anal. Biochem.* 335 (2004) 112–118.
- [19] C. Alfonso, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, *Anal. Biochem.* 344 (2005) 266–274.
- [20] M.J. Pazos, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1155–1160.



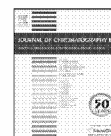
- [21] M.J. Pazos, A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 794–800.
- [22] T. Yasumoto, Y. Oshima, M. Yamaguchi, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 44 (1978) 1249–1255.
- [23] T. Yasumoto, M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto, J. Clardy, in: E.P. Ragelis (Ed.), *Seafood toxins. ACS symposium series n° 262*, American Chemical Society, Washington, DC, 1984, pp. 207–214.
- [24] C. Marcaillou-Le Baut, *Oceanis* 16 (1990) 359–374.
- [25] C.o.t.E. Communities, *Official J. Eur. Communities L* 075 (2002) 62–64.
- [26] T. Yasumoto, A. Takizawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1775–1777.
- [27] H. Ramstad, S. Larsen, T. Aune, *Toxicon* 39 (2001) 1393–1397.
- [28] H. Goto, T. Igarashi, M. Yamamoto, M. Yasuda, R. Sekiguchi, M. Watai, K. Tanno, T. Yasumoto, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 181–189.
- [29] L.R. Briggs, C.O. Miles, J.M. Fitzgerald, K.M. Ross, I. Garthwaite, N.R. Towers, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5836–5842.
- [30] S. Pierotti, C. Malaguti, A. Milandri, R. Poletti, G. Paolo Rossini, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 208–216.
- [31] A. Alfonso, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 93–99.
- [32] M.F. Perrin, *J. Phys. Radium* 7 (1926) 390–401.
- [33] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 1999.
- [34] (1995), pp. 3324–3330, *Diario Oficial de Galicia*, N°87, luns 8 de maio de 1995.
- [35] C. Marcaillou-Le Baut, P. Masselin, in: E. Granéli, E.B. Sundström, L. Edler, D.M. Anderson (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier Science Inc., New York, 1990, pp. 485–488.
- [36] E.A. Sar, M.E. Ferrario, B. Reguera, *Floraciones algales nocivas en el cono sur americano*, Instituto Español de Oceanografía (2002).
- [37] M.R. Vieytes, O.I. Fontal, F. Leira, J.M. Baptista de Sousa, L.M. Botana, *Anal. Biochem.* 248 (1997) 258–264.
- [38] Yasumoto, T. (2004).
- [39] I.A. Samdal, J.A. Aasen, L.R. Briggs, E. Dahl, C.O. Miles, *Toxicon* 46 (2005) 7–15.
- [40] M.A. Quilliam, P. Hess, C. Dell'Aversano, in: W.J. Koe, R.A. Samson, H.P. Van Egmond, J. Gilbert, M. Sabino(Eds.), *Tenth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, 2001, pp. 383–391, Guarujá, Brazil.
- [41] A.L. MacKenzie, T. Suzuki, J. Adamson, in: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch, R.J. Lewis(Eds.), *Harmful algal blooms 2000*, pp. 371–374, IOC of UNESCO, Hobart, Australia, 2001.
- [42] A. Franchini, A. Milandri, R. Poletti, E. Ottaviani, *Toxicon* 41 (2003) 967–970.
- [43] M.A. Quilliam, in: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella(Eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 211–245, UNESCO, France, 2003.
- [44] M.L. Fernández, D.J.A. Richard, A.D. Cembella, in: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella(Eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 347–380, UNESCO, France, 2003.
- [45] D.M. Jameson, E. Gratton, J.F. Eccleston, *Biochemistry* 26 (1987) 3894–3901.
- [46] A. Murakami, M. Nakaura, Y. Nakatsuji, S. Nagahara, Q. Tran-Cong, K. Makino, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4097–4102.
- [47] I. Nazarenko, R. Pires, B. Lowe, M. Obaidy, A. Rashtchian, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2089–2195.
- [48] D.M. Jameson, W.H. Sawyer, *Methods Enzymol* 246 (1995) 283–300.

**II.1. Purification of five azaspiracids from mussel samples  
contaminated with DSP toxins and azaspiracids.**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Purification of five azaspiracids from mussel samples contaminated with DSP toxins and azaspiracids

Carmen Alfonso<sup>a</sup>, Amparo Alfonso<sup>a</sup>, Paz Otero<sup>a</sup>, Paula Rodríguez<sup>a</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>b</sup>, Chris Elliott<sup>c</sup>, Cowan Higgins<sup>d</sup>, Luis M. Botana<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain

<sup>c</sup> Institute of Agri-Food and Land, School of Biological Sciences, Queen's University, Belfast, Stranmillis Road, Belfast BT9 5AG, Northern Ireland, United Kingdom

<sup>d</sup> Institute of Agri-Food and Land Use, Stoney Road, Belfast BT4 3SD, Northern Ireland, United Kingdom

<sup>e</sup> EU-Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), Estación Marítima s/n, Vigo 36200, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 December 2007

Accepted 25 February 2008

Available online 29 February 2008

#### Keywords:

Azaspiracids

OA

DTX-2

DSP toxins

Purification

Preparative HPLC

LC/MS

SPE

AZA1

AZA2

AZA3

AZA4

AZA5

### ABSTRACT

Human intoxications during toxic episodes in shellfish are a very important concern for public health, as well as for economic interests of producer regions. Although initially each toxin appeared in a determined geographical zone, nowadays many of them are found in multiple places worldwide. In addition, more toxic compounds (new toxins or new analogs of known toxins) are being isolated and identified, which bring about new risks for public health. An example of this situation is the group of azaspiracids (AZAs). Initially these toxins were concentrated in Irish coasts but today appear in many different geographic locations; in the first toxic episode only three analogs were isolated, but now it is known that the group is comprised of at least eleven identified compounds. A substantial problem associated with all these new toxins is the extreme difficulty associated with the study of their toxic effects and mechanisms of action due to the very small quantities of purified toxin available. Therefore, the study of procedures to isolate them from contaminated shellfish or to synthesize them is of tremendous importance. In this paper we design a complete procedure to obtain AZAs analogs from mussels contaminated with DSP toxins and azaspiracids by means of three consecutive steps: an extraction procedure to remove toxins from shellfish, a solid phase extraction (SPE) to clean the samples and separate DSP toxins and AZAs, and a preparative HPLC to isolate each analog. In all the steps LC/MS is used to detect and quantify the toxins. Large amounts of AZA1, AZA2, AZA3, AZA4 and AZA5 were obtained by use of this procedure, which can be utilized in future studies relating to the toxins such as the production of certified materials and standards.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Azaspiracids (AZAs) are a new group of toxins described during the last decade. Their first toxic episodes were reported in 1995 and 1997 with mussels collected on the coast of Ireland [1,2], and produced similar human symptoms to those associated with DSP toxins but characterized by a slow progressive paralysis in the mouse bioassay. A new molecule was isolated in extracts from these mussels and named as azaspiracid (AZA1), due to its

unusual structure with an azaspiro ring system fused to a 2,9-dioxabicyclo[3.3.1]-nonane ring, a trioxadspiropetal fused to a tetrahydrofuran ring and a carboxylic acid [3]. Synthesis of AZA1 showed that the stereochemistry initially proposed was incorrect and made possible the discovery of the correct structure [4–6].

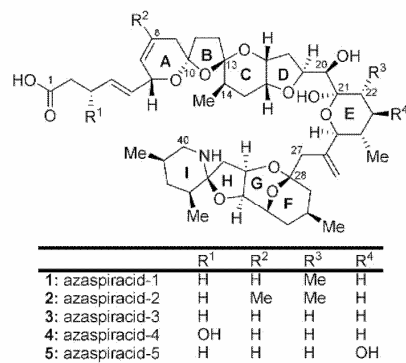
Two analogs of AZA1 (Scheme 1) were isolated in mussels from one of the first toxic episodes and named as azaspiracid-2 (AZA2, 8-methylazaspiracid) and azaspiracid-3 (AZA3, 22-demethylazaspiracid) [7]. These have recently been successfully synthesized [8]. Over the last few years more analogs have been identified in shellfish (from AZA4 to AZA11) and their structures have been described [9–11]: AZA4 and AZA5 are the 3-hydroxy and the 23-hydroxy analogs of AZA3, AZA6 is a positional isomer of AZA1, AZA7 and AZA8 are hydroxyl analogs of AZA1, AZA9 and AZA10 are hydroxyl analogs of AZA6 and AZA11 is a hydroxyl analog of AZA2. The quantities of AZA7–AZA11 present in shellfish are extremely low, and usually account for less than 5% of the total AZAs and often even smaller ratios of these toxins are present [11].

**Abbreviations:** AZA, azaspiracid; DSP, diarrhetic shellfish poisoning; SPE, solid phase extraction; HPLC, high-performance liquid chromatography; LC/MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry; YTX, yessotoxin; DTX, dinophys-toxin; OA, okadaic acid; HP, hepatopancreas; MeOH, methanol; AcH, acetic acid.

\* Corresponding author at: Dpto. Farmacología, Facultad de Veterinaria, Lugo 27002, Spain. Tel.: +34 982 252 242; fax: +34 982 252 242.

E-mail address: [Luis.Botana@lugo.usc.es](mailto:Luis.Botana@lugo.usc.es) (L.M. Botana).

1570-0232/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jchromb.2008.02.020



Scheme 1. Structures of various AZAs analogs.

AZA4–AZA11 have only been isolated in shellfish extracts, whereas AZA1–AZA3 have also been identified in extracts of cells of *Protoperdinium crassipes* [12], suggesting that the remainder of the analogs are products of bioconversion in shellfish. The predator characteristics of the identified microorganism make it impossible to determine if it produces the toxins or transforms a precursor molecule produced by another dinoflagellate or simply acquires them by feeding [12].

Although initially AZAs only appeared in mussels from Ireland, later they were detected in other bivalve molluscs, such as oysters, scallops, clams and cockles [13], and in other regions, such as north-east England and south-west Norway [14], north-west France and north-west Spain [15] and north-west Morocco [16]. Distribution of AZAs in mussel tissues has been studied with variable results. In one experiment AZA1–AZA3 were distributed throughout tissues, with AZA1 being predominant in the digestive glands and AZA3 in the remaining tissues [17]; whereas in another study AZAs were accumulated in the digestive glands only [18].

EU legislation established that the maximum level of AZAs (AZA1–AZA3) in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods is 160 µg of azaspiracid equivalents per kilogram (measured in the whole body or any part edible separately) [19].

Lack of large quantities of AZAs, isolated from naturally contaminated samples or synthesized, has made the study of their effects and mechanisms of action extremely difficult. An intraperitoneal lethal dose for AZA1 in mice has been determined to be 0.2 mg/kg, for AZA2 0.11 mg/kg and for AZA3 0.14 mg/kg [7]; whereas AZA4 and AZA5 showed less toxicity, as expected being products of bioconversion in shellfish [9]. Even several papers have been published about the cellular effects of AZAs, unfortunately the intracellular target of these toxins has not yet been determined.

Detection and quantification of marine toxins can be performed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry [20,21]. This versatile technique has a high degree of sensitivity and selectivity and allows the simultaneous quantification of multiple compounds, obtaining information about their molecular weights and structural conformations.

The aim of the present study was to isolate AZA1–AZA5 analogs from contaminated mussels that contain DSP toxins and AZAs. These shellfish were extracted and partitioned with various solvents. Subsequently the two groups of toxins (DSP and AZAs) were separated by a solid phase extraction (SPE) procedure and finally AZAs analogs were isolated by HPLC. Quantification of toxins during

the purification process was achieved by LC/MS/MS using atmospheric pressure ionization techniques.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Solvents used in this paper were of HPLC or analytical grade quality. Acetone, methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, acetic acid glacial, trifluoroacetic acid and acetonitrile were from Panreac (Spain). Formic acid was from Merck (Spain). Ammonium formate was from Fluka (Switzerland). Water with a high degree of purity was obtained by a prepurification filter system followed by the water purification system Arium 611 from Sartorius (Germany).

Standard solution of OA was provided by NRC Certified Reference Materials Program (Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canada). DTX-1, DTX-2, and YTX standards were kindly provided by Dr. T. Yasumoto; AZA1, AZA2, AZA3, AZA4 and AZA5 standards were kindly provided by Dr. M. Satake (Japan).

### 2.2. Technology

- Evaporators: Büchi® Syncore Systems for Parallel Evaporation (from Büchi, Switzerland), rotary evaporator R-200 (from Büchi) and VV2000 (from Heidolph, Germany) with vacuum controller (from Büchi) and centrifugal evaporator RC 10 09 (from Jouan, France).
- HPLC system: preparative and analytical HPLC were done with the same equipment from Waters (USA), which consists of pump (Delta 600), sample manager (2767), fraction collector (III) and controller (600), coupled to a column oven (CTO-10ACvp) from Shimadzu (Japan).
- LC/MS system: HPLC system Shimadzu, which consists of two pumps (LC-10ADvp), autoinjector (SIL-10ADvp) with refrigerated rack, degasser (DGU-14A), column oven (CTO-10ACvp) and system controller (SCL-10Avp), coupled to a QTRAP LC/MS/MS system (from Applied Biosystems, USA), which consists of a hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometer equipped with an API fitted with an ESI source. Nitrogen generator NM20ZA (from Peak Scientific, USA).

### 2.3. Mussel samples

Mussels were collected in Ireland during a harmful algal bloom (with OA, DTXs and AZAs) in 2006. The whole flesh tissue was removed from the shell and frozen.

Samples were defrosted, interstitial liquid was collected and digestive glands were carefully separated from the rest of the meat using clamps and scissors.

After this process 2.6 kg of digestive glands, 12.85 kg of meat and 5.6 kg of liquid were obtained. Meat and liquid were mixed and divided in six homogeneous portions of approximately 3 kg each one.

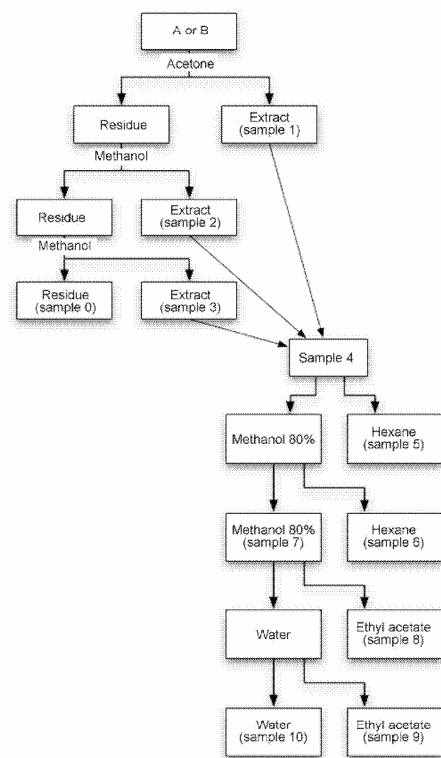
Two samples were processed:

- (A) Digestive glands (2.6 kg).
- (B) One portion of the mixture of meat and liquid (3 kg).

### 2.4. Extraction procedure (see Scheme 2)

The extraction procedure was the same for A and B (Scheme 2).

Sample was homogenized, mixed with acetone (using a volume of three times the weight, 3:1) and filtered. The extract (sample 1) was collected and vacuum dried. The residue was mixed with methanol (3:1) twice and filtered. These two extracts (samples 2



Scheme 2. Extraction procedure.

and 3) were mixed and vacuum dried. Finally samples 1–3 were mixed and named as sample 4.

Sample 4 was partitioned with 1:1 hexane and methanol (80%). The hexane layer (sample 5) was collected and the methanol layer was partitioned again with new hexane. The hexane layer (sample 6) was collected and the methanol layer, which contained the toxins, was vacuum dried (sample 7).

Sample 7 was partitioned with ethyl acetate and water (1:1). The ethyl acetate layer (sample 8) was collected and the water layer was partitioned again with new ethyl acetate. The two final layers (named as sample 9: ethyl acetate and sample 10: water) were collected separately.

The extracts obtained in all the steps of this procedure were analyzed by LC/MS.

## 2.5. Solid phase extraction

A SPE with silica was utilized to separate OA, DTXs and AZAs, using two types of cartridges: 2 ml empty polypropylene (from SUPELCO, Spain) filled with silica gel 60 (230–400 mesh ASTM, from Merck) and LC silica packing 20 ml (from SUPELCO). All cartridges were wetted with acetone before charging the sample, which was also dissolved in acetone. After adding the sample, cartridges were

washed with acetone and finally they were eluted with methanol. The SPE was done using a VAC ELUT SPS 24 (from Varian, USA). The acetone and methanol extracts obtained during the SPE were collected separately and analyzed by LC/MS.

## 2.6. HPLC

Samples injected in the HPLC system were previously homogenized and filtered through 0.45  $\mu$ m filters (Ultrafree-MC centrifugal filter devices from Millipore, Spain). Different AZAs analogs were separated using the following columns: Luna 5  $\mu$ m C18(2) (150 mm  $\times$  2 mm) with 4 mm  $\times$  2 mm security guard cartridge for analytical assays and Luna 5  $\mu$ m C18(2) (150 mm  $\times$  10 mm) with 10 mm  $\times$  10 mm security guard cartridge for preparative assays; all these materials were provided by Phenomenex (USA). Temperature of the column oven, sample volume injection, flow and mobile phase composition were modified to optimize the recovery and the separation of AZAs analogs in the column.

The final optimal conditions for preparative HPLC were: 35  $^{\circ}$ C in the column oven, 500  $\mu$ l sample volume injection and 2.5 ml/min isocratic flow, using a mobile phase of MeOH:H<sub>2</sub>O:AcH (700:300:1).

In all the experiments fractions were collected by time: one separated fraction was collected per minute. Each one of these fractions was vacuum dried, dissolved in methanol and analyzed by LC/MS.

## 2.7. LC/MS analysis

All the extracts collected during the extraction procedure and the SPE were analyzed by LC/MS to determine their toxins concentration. Before being injected in the LC/MS system, they were evaporated to dryness, resuspended in methanol and filtered through 0.45  $\mu$ m filters (Ultrafree-MC centrifugal filter devices from Millipore, Spain). The column fractions from preparative HPLC were evaporated to dryness and resuspended in methanol.

Separation between toxins was achieved in a BDS-Hypersil C8 3  $\mu$ m 120 A (50 mm  $\times$  2 mm) column (from Phenomenex, USA) with a 10 mm  $\times$  2.1 mm guard cartridge (from Thermo, USA), inside the column oven at 25  $^{\circ}$ C. Injection volume was 5  $\mu$ l. Mobile phase consisted of 100% water with 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid in pump A and acetonitrile:water (95:5) with 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid in pump B. Analysis were carried out using a linear gradient elution with a constant total flow of 0.2 ml/min and a run time of 14 min. In each run % B started at 30%, achieving 90% in minute 8; these conditions held during 3 min (90% B and 10% A); % B decreased to 30% in minute 11.5 and it maintained this value until next run. Analyst software was used to control the instrument, process the data and analyze them.

Extracts were analyzed with the ESI interface operating simultaneously in both positive and negative modes using the following parameters: curtain gas, 15; CAD gas, 6; IonSpray voltage, 4000 or –4000; temperature, 450; gas 1, 50; gas 2, 50; these parameters had been previously optimized using toxin standards. Fractions from preparative HPLC were analyzed with the ESI interface operating in positive mode, with the parameters listed above (IonSpray voltage: 4000). The mass spectrometer was operated in multiple reaction-monitoring (MRM), analyzing two product ions per compound: one for quantification and the other for confirmation. For ESI negative the transitions selected were: OA and DTX-2, 803.6  $>$  255.2/209.2; DTX-1, 817.6  $>$  255.2/209.2; YTX, 1141.4  $>$  1061.5/855.4. For ESI positive the transitions selected were: AZA1, 842.6  $>$  824.2/806.1; AZA2, 856.7  $>$  838.6/820.6; AZA3, 828.7  $>$  810.7/792.7; AZA4 and AZA5, 844.5  $>$  826.6/808.7. Quantification was done with the most abundant ion in the fragment spectra: 255.2 (OA and DTX-2, DTX-1), 1061.5 (YTX), 824.2 (AZA1), 838.6 (AZA2), 810.7 (AZA3) and 826.6

**Table 1**  
Results obtained during the extraction procedure of sample A

Sample	AZA1 ( $\mu\text{g}$ )	OA ( $\mu\text{g}$ )	DTX-2 ( $\mu\text{g}$ )
0	121	21	4
4	28,200	2910	548
5	0	0	0
6	61	0	0
7	43,750	2045	515
8	41,125	2088	366
9	239	5	3
10	272	0	0

Digestive glands from mussels (A) were collected, homogenized and extracted with acetone and methanol. Later on the extracts followed various partitions. Different samples, from 0 to 10, were obtained along the processes (Scheme 2) and their toxin concentrations were determined by LC/MS.

(AZA4 and AZA5), using the calibration curves obtained for each one of the standards.

### 3. Results

The objective of this study is to obtain purified AZAs analogs from contaminated mussels. These toxins must be extracted from the shellfish and separated from OA and DTXs; later on each analog must be isolated. To perform this process we use three steps: an extraction procedure from shellfish, a SPE with silica and an HPLC separation. LC/MS is used to quantify toxins concentration along the process.

#### 3.1. Extraction procedure

The extraction procedure is the same for A and B (Scheme 2). They are extracted with acetone and later on twice with methanol. The three extracts are vacuum dried and mixed, obtaining a dense final material (sample 4). To guarantee that all the toxins have been extracted, the final extraction residue (sample 0) is mixed with methanol and the toxin profile of this methanolic extract is measured, obtaining only trace amounts of OA, DTX-2 and AZA1.

Sample 4 contains OA, DTXs and AZAs, together with contaminants extracted from initial samples (A or B). Various partitions are used to eliminate undesirable compounds. The sample is solved in methanol (80%) and partitioned twice with hexane, obtaining two hexane layers (samples 5 and 6) with trace amounts of AZAs and one methanolic final layer (sample 7) with the rest of the toxins. In this step various fat layers are separated in the interface methanol/hexane, eliminating lipophilic contaminants from the final sample.

Sample 7 is vacuum dried, solved in water and partitioned twice with ethyl acetate. In this case hydrophilic contaminants are eliminated in the final watery layer (sample 10) and the toxins are concentrated in the two ethyl acetate layers (samples 8 and 9).

Results obtained during the extraction of A are shown in Table 1. AZA1 concentration in sample 4 is low with respect to samples 7 or 8, the high density of the first one produced a lack of homogeneity in the measured aliquot which can be the explication of this value. Sample 8 contains almost the overall of the initial toxins, without lipophilic and hydrophilic contaminants eliminated with the partitions.

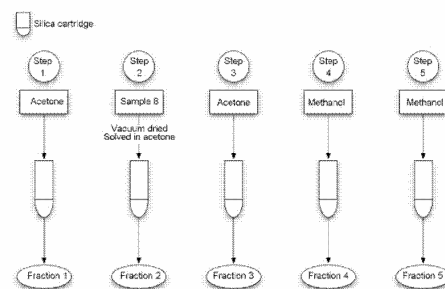
A summary of the results obtained for B is shown in Table 2. Concentrations of sample 4 are also low, due to the same difficulties than for sample A. Sample B does not contain DTX-2, but the distribution of AZA1 and OA in the different steps of the extraction corresponds with the obtained for sample A.

After analyze these results we decided to use sample 8 (from A or B) to perform the solid phase extraction and separate different groups of toxins.

**Table 2**  
Results obtained during the extraction procedure of sample B

Sample	AZA1 ( $\mu\text{g}$ )	OA ( $\mu\text{g}$ )	DTX-2 ( $\mu\text{g}$ )
0	79	5	0
4	14,325	264	0
5+6	4	0	0
7	29,475	699	0
8+9	20,966	649	0
10	385	0	0

Meat and liquid from mussels were collected, weighted and divided in six aliquots. One of them (B) was extracted with acetone and methanol. Later on the extracts followed various partitions. Different samples, from 0 to 10, were obtained along the processes (Scheme 2) and their toxin concentrations were determined by LC/MS.

**Scheme 3.** Solid phase extraction (SPE).

#### 3.2. SPE

Sample 8 contains toxins from the original sample (A or B) solved in ethyl acetate. We do a solid phase extraction with silica to separate AZAs from DSP toxins, using 600 mg of silica for 5 g of initial sample (digestive glands or meat mixed with liquid). Sample 8 must be dried and solved in acetone previously to the SPE. The process is as follows: silica cartridge is wetted with acetone and sample is charged; then the cartridge is washed with acetone and finally it is eluted with methanol. For each SPE we obtain five liquid fractions (Scheme 3), but fraction 1 only contains acetone. Results using sample 8 from digestive glands appear in Table 3. High density of sample 8 makes difficult to obtain homogeneous aliquots and due to this results in Table 3 show high variability. However, the SPE achieves the separation between OA and DTX-2, mainly in fractions 2 and 3, and AZA1, mainly in fractions 4 and 5.

Finally we scale the described process and use 64 cartridges with 5 g of silica each one, with the corresponding solvent volumes, separating OA and DTX-2 in the acetone fractions (mixed and called as sample C) and AZA1 in the methanol fractions (mixed and called as sample D). An example of the results with these cartridges appears in Table 4. It shows the high variability of the process, again due

**Table 3**  
SPE results obtained using sample 8 from digestive glands

	AZA1 (ng)	OA (ng)	DTX-2 (ng)
Fraction 2	53.5 $\pm$ 43.3	435.8 $\pm$ 9.5	79.5 $\pm$ 2.8
Fraction 3	736.1 $\pm$ 318.2	344.4 $\pm$ 65.1	68.7 $\pm$ 4.8
Fraction 4	33,757.5 $\pm$ 2,992.5	18.8 $\pm$ 3.5	5.1 $\pm$ 0.7
Fraction 5	12,799.5 $\pm$ 1,606.5	18.4 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 0.3

Three aliquots of 210  $\mu\text{l}$  of sample 8 were collected, vacuum dried and solved in acetone. They were charged in 2 ml silica cartridges previously wetted with acetone. Later on they were washed with the same solvent and eluted with methanol. Different fractions, from 1 to 5, were obtained along the process (Scheme 3) and their toxin concentrations were determined by LC/MS. Mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments.

**Table 4**

SPE results obtained using sample 8 from digestive glands and 20 ml silica cartridges

	AZA1 ( $\mu\text{g}$ )	OA (ng)	DTX-2 (ng)
Fraction 2 + 3	2,129 $\pm$ 0.003	11,655 $\pm$ 2,575	759.3 $\pm$ 124.8
Fraction 4 + 5	651.31 $\pm$ 111.19	0	0

Three aliquots of 1750  $\mu\text{l}$  of sample 8 were collected, vacuum dried and solved in acetone. They were charged in 20 ml silica cartridges previously wetted with acetone. Later on they were washed with the same solvent and eluted with methanol. Different fractions, from 1 to 5, were obtained along the process (Scheme 3) and their toxin concentrations were determined by LC/MS. Mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments.

to the high density of sample 8, and the suitability of this SPE to achieve an AZA1 extract (fractions 4 and 5) without OA and DTX-2.

Similar results (not shown) are obtained using sample 8 from meat and liquid.

### 3.3. HPLC separation

Separation between different groups of toxins was achieved in the previous step, obtaining a sample D without OA and DTX-2. HPLC is then used to isolate different AZAs analogs (1–5) in this sample. Bibliography describes various protocols to achieve this objective, using different columns, flows, temperatures and mobile phases [10–12,17,18,22–27]. In a first step we try to optimize all these parameters by analytical HPLC and later on scale the process to preparative HPLC.

Different protocols in analytical HPLC were tested to determine which one achieves greater recovery and better separation of AZAs analogs. Several mobile phases with different compositions, various heater conditions and sample volumes were tested. The best results were obtained using MeOH:H<sub>2</sub>O:AcH (700:300:1) at 0.2 ml/min, 35 °C and 20  $\mu\text{l}$  injection volume.

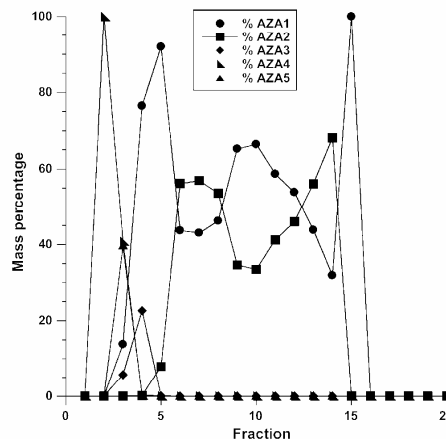
The characteristics used in preparative HPLC are similar to analytical, except volume of injected sample (500  $\mu\text{l}$  instead of 20  $\mu\text{l}$ ) and mobile phase flow (5 ml/min instead of 0.2 ml/min). Fractions are collected each minute, dried, solved in methanol and analyzed by LC/MS. Results appear in Table 5 and Fig. 1. Percentages of recovery for AZA1, AZA3 and AZA4 are high, whereas for AZA2 and AZA5 are lower, always above 50%. Fig. 1 shows percentages of purity of the analyzed fractions. Separation between AZAs analogs is not good since all of them leave the column in the first 15 min and most of the fractions contain more than one analog. To avoid this problem the mobile phase flow is modified, using 2.5 ml/min instead of 5 ml/min. Results appear in Table 6 and Fig. 2. This modification maintains high percentages of recovery (except for AZA2, probably due to an experimental mistake) and achieves better separation between analogs. Therefore, purification of AZAs analogs can be done in preparative HPLC using MeOH:H<sub>2</sub>O:AcH (700:300:1) at 2.5 ml/min, 35 °C and 500  $\mu\text{l}$  injection volume.

**Table 5**

AZAs recovery in preparative HPLC

	m (ng)	% recovery
AZA1	147,727	81.8
AZA2	23,047	64.7
AZA3	4,122	88.6
AZA4	970	86
AZA5	982	61

An isocratic flow of 5 ml/min was used, with a mobile phase composed by MeOH:H<sub>2</sub>O:AcH (700:300:1). The oven temperature was 35 °C and the injected sample volume was 500  $\mu\text{l}$ . 60 fractions of 1 min each one were collected and their toxin concentrations were measured by LC/MS. % recovery was calculated comparing the total amounts in the 60 fractions collected with the injected quantities in the 500  $\mu\text{l}$  initial sample.



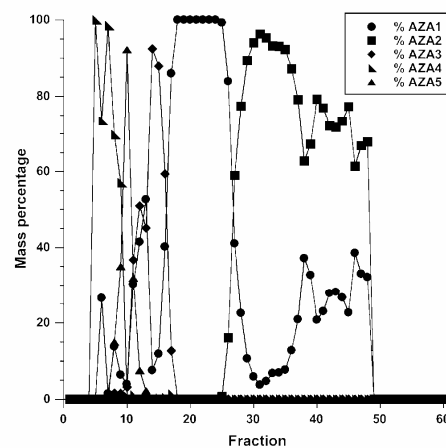
**Fig. 1.** Mass percentage of AZAs analogs in fractions collected in preparative HPLC. The mass percentage of each AZA analog was calculated in fractions obtained in the assay described in Table 5, although fractions from 21 to 60 are not represented because they do not contain any analog.

**Table 6**

AZAs recovery in preparative HPLC, with a mobile phase flow of 2.5 ml/min

	m (ng)	% recovery
AZA1	161,902	89.7
AZA2	13,506	37.9
AZA3	3,033	65.2
AZA4	1,000	88.7
AZA5	1,383	85.5

An isocratic flow of 2.5 ml/min was used, with a mobile phase composed by MeOH:H<sub>2</sub>O:AcH (700:300:1). The oven temperature was 35 °C and the injected sample volume was 500  $\mu\text{l}$ . Sixty fractions of 1 min each one were collected and their toxin concentrations were measured by LC/MS. % recovery was calculated comparing the total amounts in the 60 fractions collected with the injected quantities in the 500  $\mu\text{l}$  initial sample.



**Fig. 2.** Mass percentage of AZAs analogs in fractions collected using preparative HPLC, with a mobile phase flow of 2.5 ml/min. The mass percentage of each AZA analog was calculated in fractions obtained in the assay described in Table 6.

**Table 7**  
AZAs recovery in four injections in preparative HPLC with a mobile phase flow of 2.5 ml/min

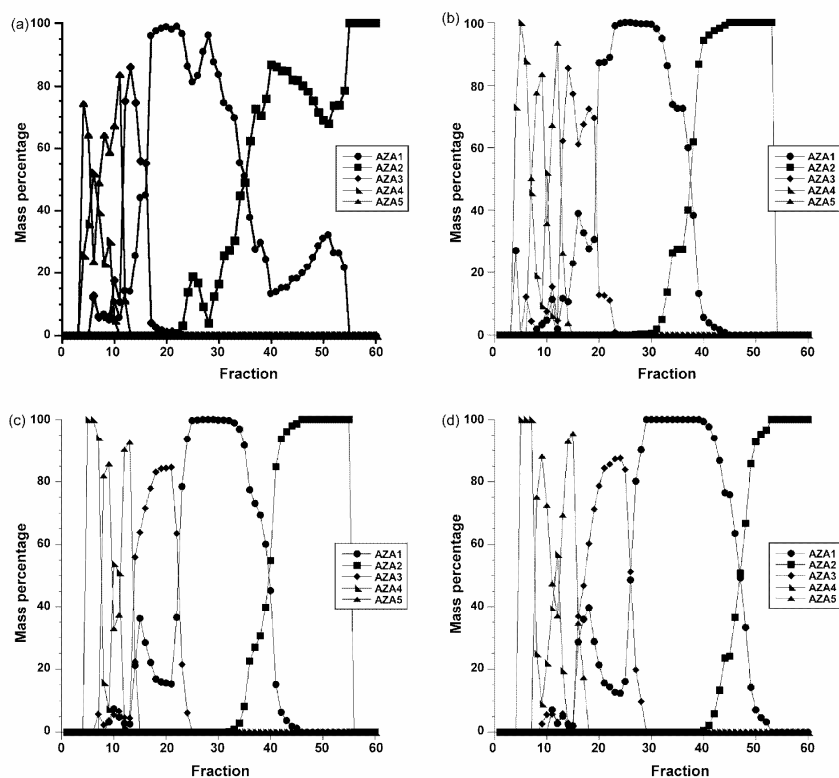
	Injection a	Injection b	Injection c	Injection d	Media	S.E.M.
AZA1 (ng)	58,542	59,426	71,188	56,579	61,434	3,305
AZA2 (ng)	9,603	9,837	11,218	8,002	9,665	659
AZA3 (ng)	1,657	1,454	1,915	1,529	1,639	101
AZA4 (ng)	375	366	354	466	391	26
AZA5 (ng)	1,310	1,581	1,370	1,786	1,512	108

Repeatability of the method described in Table 6 and Fig. 2 was determined by four injections with the same characteristics. Total amount of each analog was calculated in each injection and compared with the other ones.

Finally we verify the repeatability of the protocol doing four sample injections. Before this we dilute sample D to decrease the viscosity and achieve that the injected samples were more homogeneous than in the previous experiments. Table 7 shows AZAs amount in the fractions collected after four injections (a–d) of diluted sample D, with a high repeatability. Separation between analogs is shown in Fig. 3. Time distribution of the analogs varies between different injections, but the curve profile of each one remains constant.

#### 4. Discussion

Although initially AZAs contamination of shellfish was a problem located in a determinate geographical extension [1,2], nowadays analogs of this toxin appear in different coasts and can become a worldwide problem. Investigations about their mechanism of action and toxicity are reduced due to limited availability of standards and certified materials. In this paper we study the large-scale isolation of different AZAs analogs from a contaminated



**Fig. 3.** Mass percentage of AZAs analogs in fractions collected in four injections in preparative HPLC with a mobile phase flow of 2.5 ml/min. The mass percentage of each AZA analog was calculated in fractions obtained in the assays described in Table 7. a: injection a, b: injection b, c: injection c, d: injection d.



**Table 8**

Amounts and concentrations of toxins in HP and meat + liquid calculated from data obtained during the extraction procedure

	HP ( $\mu\text{g}$ )	Meat + liquid ( $\mu\text{g}$ )	HP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Meat + liquid ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AZA1	41,364	125,796	15,909	6,818
OA	2,093	3,894	805	211
DTX-2	369	0	142	0

Samples A (digestive glands of mussels) and B (the sixth part of the rest of the mussel meat and the interstitial liquid collected) were extracted and partitioned with various solvents. Finally two ethyl acetate layers (samples 8 and 9) were collected for each one of the initial samples and measured by LC/MS, containing AZA1, OA and DTX-2. With these results we calculated the amounts and the concentrations of toxins in the hepatopancreas (HP) and in the rest of the mussel meat and the interstitial liquid (meat + liquid) of the initial mussel sample, considering that the masses of these two parts were 2.6 kg and 18.45 kg, respectively.

mussel sample (with AZAs and DSP toxins), which will be used in basic investigations.

The initial sample (frozen mussels) was defrosted and divided in two parts: one with the digestive glands and the other one with the rest of the meat and the interstitial liquid, in order to compare toxic profiles in meat and hepatopancreas. We processed two samples: sample A contained all the digestive glands (2.6 kg) and sample B contained a sixth part of the homogenate of meat and liquid (approximately 3 kg from a total of 18.45 kg). There are some papers about the extraction of AZAs from shellfish. In the first toxic episodes [7], these toxins were extracted with acetone and twice with methanol, followed by a partition in hexane and methanol 80%, being AZAs concentrated in the methanolic phase. Other authors showed that two extractions with acetone remove AZAs from shellfish homogenate efficiently [17], followed by a partition in water and ethyl acetate [11]. Finally, some authors suggest that methanol can be the better extraction solvent with some shellfish matrices [18]. Our first objective was to extract the largest possible amounts of AZAs analogs, so we decided to apply a complete and laborious procedure, the same for the two tested samples. We did three extractions, one with acetone and two with methanol, in order to remove all the AZAs from the shellfish samples. After this, we mixed and evaporated the obtained extracts. The two partitions previously described (hexane/methanol 80% and water/ethyl acetate) were used to separate the largest possible amount of contaminants and the order between them was selected to avoid the mixing of various solvents. As the extract from shellfish contained acetone and methanol and the acetone boiling point is lower than methanol one, the evaporated residue could contain trace amounts of methanol. Therefore, it was dissolved in methanol 80% and partitioned with hexane. This process achieved the elimination of various fat layers and lipophilic components solved in the hexane phases, being all the toxins dissolved in the final methanolic layer, which was vacuum dried. Since this layer contained methanol and water and the water boiling point is higher than methanol one, the evaporated residue could contain trace amounts of water. So, it was dissolved in water and partitioned with ethyl acetate. With this process, hydrophilic contaminants were eliminated in the aqueous layer and the toxins (AZA1, OA and DTX-2) were separated in the two ethyl acetate layers (samples 8 and 9) obtained for each one of the initial samples.

Results show that OA concentration in HP is 3.8 times higher than in meat + liquid, whereas AZA1 concentration in HP is only 2.3 times higher and DTX-2 is located in HP. This means that shellfish body distribution is not the same for all toxins, perhaps due to different chemical properties like polarity. This points that the whole body of shellfish must be analyzed in routine AZAs controls, since there is not a high difference between AZA1 concentration in HP and meat + liquid, far away from the fivefold difference measured by some authors [18] and near the percentages found by another [17]. Table 8 summarizes the amounts and the concentrations of toxins in the initial samples calculated from the extraction results, considering that the quantity of toxins in HP is the amount of samples 8 and 9 from A whereas the quantity in meat + liquid is six times the amount of samples 8 and 9 from B.

Samples 8 and 9 obtained after the extraction procedure contained all the initial toxins with contaminants and pigments. Due to this a cleaning procedure was applied to isolate AZAs from the rest of the sample. Literature contains a lot of references about solid phase extractions with different cartridges (silica, diol and C18) and mobile phases (acetone, methanol, chloroform or water) [7,11,25], as well as gel permeation [7] or flash chromatography [11]; all of them are processes applied to clean extracts and obtain purified toxins. With these references and from previous experiences on toxins purification [28], we designed a SPE with silica, using acetone and methanol as mobile phases and achieving the separation between DSP toxins and AZAs analogs. Different elutotropic properties of these solvents on silica, together with solubility characteristics of the toxins make possible the isolation of AZAs analogs in the methanolic phase. This process does not depend on the matrix since separation is achieved with samples from HP and from the rest of the meat and liquid, and can be successfully scaled to bigger amounts of samples. The separation of the two groups of toxins is essential to avoid interferences during the later purification of AZAs analogs, so the SPE designed is one of the most important steps of this study.

AZAs analogs were isolated from the mixture previously obtained (sample D), using a chromatographic process described in various references, each one with its own characteristics [10–12,17,18,22–27]. From these data, different protocols were tested in an analytical column and the one with best results was selected to scale up to the preparative process. Even either methanol or acetonitrile can be used; best results were obtained with methanol. The key of the process was the adjustment of the mobile phase flow in preparative to achieve the highest recovery and purity of AZAs analogs. The % of recovery remains constant between injections with some variations in the time of collection. These problems are being solved equilibrating the column during more time and washing between consecutive injections.

LC/MS is used along the study to determine toxin concentrations in the samples. In this case the chromatographic characteristics employed guarantee the separation of the lipophilic toxins tested and the mass spectrometry method (multiple reaction monitoring) allows the detection of all of them simultaneously. Only interferences between AZA4 and AZA5 can be observed, because the selected mass transitions are the same ( $844.5 > 826.6/808.7$ ) and their retention times in column are very similar (4 min and 4.50 min, respectively). To solve this problem other transitions, different for AZA4 and AZA5, could be used, at least in fractions in which these are the most abundant toxins.

This paper shows a laborious method that allows obtaining large quantities of AZAs analogs, which can be used in the future in different investigations and/or in the production of certified materials and standards.

#### Acknowledgements

Carmen Alfonso was funded with fellowship MEC AP-2004-5731. This work was funded with grants: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain; Grant numbers: SAF2003-08765-C03-

02, REN2001-2959-C04-03, REN2003-06598-C02-01, AGL2004-08268-02-02/ALI, AGL2006-08439/ALI. Xunta de Galicia, Spain; Grant numbers: PGIDT99INN26101, PGIDIT03AL26101PR and PGIDIT04TAL261005PR. Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain; Grant number: FISS PI050323. EU Vith Frame Program; Grant number: IP FOOD-CT-2004-06988 (BIOCOP) and STREP FOOD-CT-2004-514055 (DETECTOX), CRP 030270-2 (SPIES-DETOX).

## References

- [1] T. McMahon, J. Silke, *Harmful Algae News* 14 (1996) 2.
- [2] T. McMahon, J. Silke, *Harmful Algae News* 17 (1998) 12.
- [3] M. Satake, K. Ofuji, H. Naoki, K.J. James, A. Furey, T. McMahon, J. Silke, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 9967.
- [4] K.C. Nicolaou, P.M. Pihko, F. Bernal, M.O. Frederick, W. Qian, N. Uesaka, N. Diedrichs, J. Hinrichs, T.V. Koftis, E. Loizidou, G. Petrovic, M. Rodriguez, D. Sarlah, N. Zou, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2244.
- [5] K.C. Nicolaou, D.Y. Chen, Y. Li, N. Uesaka, G. Petrovic, T.V. Koftis, F. Bernal, M.O. Frederick, M. Govindasamy, T. Ling, P.M. Pihko, W. Tang, S. Vyskocil, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2258.
- [6] K.C. Nicolaou, T.V. Koftis, S. Vyskocil, G. Petrovic, W. Tang, M.O. Frederick, D.Y. Chen, Y. Li, T. Ling, Y.M. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2859.
- [7] K. Ofuji, M. Satake, T. McMahon, J. Silke, K.J. James, H. Naoki, Y. Oshima, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 7 (1999) 99.
- [8] K.C. Nicolaou, M.O. Frederick, G. Petrovic, K.P. Cole, E.Z. Loizidou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 (2006) 2609.
- [9] K. Ofuji, M. Satake, T. McMahon, K.J. James, H. Naoki, Y. Oshima, T. Yasumoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 740.
- [10] A. Furey, A. Brana-Magdalena, M. Lehane, C. Moroney, K.J. James, M. Satake, T. Yasumoto, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 238.
- [11] K.J. James, M.D. Sierra, M. Lehane, A. Brana Magdalena, A. Furey, *Toxicon* 41 (2003) 277.
- [12] K.J. James, C. Moroney, C. Roden, M. Satake, T. Yasumoto, M. Lehane, A. Furey, *Toxicon* 41 (2003) 145.
- [13] A. Furey, C. Moroney, A. Brana-Magdalena, M.J. Saez, M. Lehane, K.J. James, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3078.
- [14] K.J. James, A. Furey, M. Lehane, H. Ramstad, T. Aune, P. Hovgaard, S. Morris, W. Hignman, M. Satake, T. Yasumoto, *Toxicon* 40 (2002) 909.
- [15] A.B. Magdalena, M. Lehane, S. Kryz, M.L. Fernandez, A. Furey, K.J. James, *Toxicon* 42 (2003) 105.
- [16] H. Taleb, P. Vale, R. Amanhir, A. Benhadouch, R. Sagou, A. Chafik, *J. Shellfish Res.* 25 (2006) 1067.
- [17] K.J. James, M. Lehane, C. Moroney, P. Fernandez-Puente, M. Satake, T. Yasumoto, A. Furey, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 555.
- [18] P. Hess, L. Nguyen, J. Aasen, M. Keogh, J. Kilcoyne, P. McCarron, T. Aune, *Toxicon* 46 (2005) 62.
- [19] European Communities Official Journal L 075, 16/03/2002, 2002, 0064.
- [20] M.A. Quilliam, in: D. Barceló (Ed.), *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1996, p. 543.
- [21] P. McNabb, A.I. Selwood, P.T. Holland, J. Aasen, T. Aune, G. Eaglesham, P. Hess, M. Igarishi, M. Quilliam, D. Slattery, J. Van de Riet, H. Van Egmond, H. Van den Top, T. Yasumoto, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 761.
- [22] K. Ofuji, M. Satake, Y. Oshima, T. McMahon, K.J. James, T. Yasumoto, *Nat. Toxins* 7 (1999) 247.
- [23] R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, A. Furey, K.J. James, M. Satake, T. Yasumoto, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 13.
- [24] M. Lehane, A. Brana-Magdalena, C. Moroney, A. Furey, K.J. James, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 139.
- [25] C. Moroney, M. Lehane, A. Brana-Magdalena, A. Furey, K.J. James, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 353.
- [26] D.A. Volmer, S. Brombacher, B. Whitehead, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 2298.
- [27] M. Lehane, M.J. Fidalgo Saez, A.B. Magdalena, I. Ruppen Canas, M. Diaz Sierra, B. Hamilton, A. Furey, K.J. James, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 63.
- [28] C. Alfonso, A. Alfonso, M.J. Pazos, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, A. Milandri, R. Poletti, L.M. Botana, *Anal. Biochem.* 363 (2007) 228.

**II.2. Evaluation of various pH and temperature conditions on the stability of azaspiracids and their importance in preparative isolation and toxicological studies.**

Anal. Chem. 2008, 80, 9672–9680

## Evaluation of Various pH and Temperature Conditions on the Stability of Azaspiracids and Their Importance in Preparative Isolation and Toxicological Studies

Carmen Alfonso,<sup>†</sup> Nils Rehmann,<sup>\*,§</sup> Philipp Hess,<sup>\*,†,||</sup> Amparo Alfonso,<sup>†</sup> Carolina B. Wandscheer,<sup>†</sup> María Abuín,<sup>†</sup> Carmen Vale,<sup>†</sup> Paz Otero,<sup>†</sup> Mercedes R. Vieytes,<sup>||</sup> and Luis M. Botana<sup>\*,†</sup>

Departamentos de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain, Marine Institute, Rinville, Oranmore, County Galway, Ireland, and School of Biomolecular and Biomedical Sciences, University College Dublin, Belfield Campus, Dublin 4, Ireland

Azaspiracids (AZAs) are a group of shellfish toxins that were discovered in mussels from Irish waters in 1995. Because of the rare occurrence of poisoning incidents, the toxicity of the compounds is a continued matter of debate. Neither their mechanism of action nor their pharmacokinetic behavior has been elucidated, principally because of the lack of standards and reference tissues. Procedures to isolate AZAs from contaminated shellfish or to synthesize them have been developed; in particular, the procedures used for the preparative isolation of these toxins are currently being improved. The present paper describes the stability of AZAs in an array of pH and temperature conditions in methanolic solution, in shellfish tissue, and in aqueous mixtures of acids and shellfish tissues. Strong acids such as hydrochloric and formic acid led to rapid degradation of AZA1 at mM concentration, while the weaker acetic acid required harsher temperature conditions (70 °C) and greater concentrations to show similar effects. AZAs showed much greater stability in aqueous acidic mixtures with shellfish tissues, suggesting a significant protective effect of the matrix. A mechanism for the acid-catalyzed degradation is proposed, supported by mass spectral evidence from some of the degradation products. Strong bases (sodium hydroxide) also showed a detrimental effect on AZA1; however, weaker bases (ammonium hydroxide) did not lead to degradation over 24 h at room temperature. Finally, the toxic potential of acid degradation products of AZAs was found to be dramatically reduced compared to the parent compounds, as assessed through cytotoxicity.

Mussels from Ireland caused two toxic episodes in 1995 and 1997, with human symptoms like nausea, vomiting, severe diarrhea, and stomach cramps. In that moment no toxin could be

related with those incidents because of the low quantities of DSP toxins and PSP toxins in shellfish samples and the lack of known toxic phytoplankton species in water samples.<sup>1,2</sup> Later those mussels were analyzed to isolate causative toxins, obtaining a molecule with a particular chemical structure among marine toxins, which was named as azaspiracid (AZA1). It showed an azaspiro ring system fused to a 2,9-dioxabicyclo[3.3.1]-nonane ring, a trioxadipiroketal fused to a tetrahydrofuran ring and a carboxylic acid.<sup>3</sup> In the same mussel samples two analogues of AZA1 were also isolated, the 8-methylazaspiracid (AZA2) and the 22-demethylazaspiracid (AZA3).<sup>4</sup> Nowadays, the group of azaspiracids (AZAs) is formed by a lot of analogues, with dihydroxy-, carboxy-, carboxy-hydroxy-, and dehydro-AZAs, as well as methyl esters.<sup>5</sup>

AZA1, AZA2, and AZA3 were detected in extracts of cells of *Protoperdinium crassipes*, but lack of assays and predator characteristics of this microorganism make it impossible to determine if it produces the toxins, transforms a precursor produced by another dinoflagellate, or simply acquires them by feeding.<sup>6</sup> AZAs have been detected in Ireland, England and Norway,<sup>7</sup> France and Spain<sup>8</sup> or Morocco,<sup>9</sup> in mussels, oysters, scallops, clams, and cockles.<sup>10</sup> These episodes together with the widespread distribution of *P. crassipes* in coastal temperate and tropical waters<sup>11</sup> suggest that AZAs can become a worldwide problem.

Toxicological properties of this group of toxins are being studied to determine the maximum levels in shellfish for human

- (1) McMahon, T.; Silke, J. *Harmful Algae News* **1996**, *14*, 2.
- (2) McMahon, T.; Silke, J. *Harmful Algae News* **1998**, *17*, 12.
- (3) Satake, M.; Otsuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9967–9968.
- (4) Otsuji, K.; Satake, M.; McMahon, T.; Silke, J.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 99–102.
- (5) Rehmann, N.; Hess, P.; Quilliam, M. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 549–558.
- (6) James, K. J.; Moroney, C.; Roden, C.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Lehane, M.; Furey, A. *Toxicon* **2003**, *41*, 145–151.
- (7) James, K. J.; Furey, A.; Lehane, M.; Ramstad, H.; Anne, T.; Hovgaard, P.; Morris, S.; Hignan, W.; Satake, M.; Yasumoto, T. *Toxicon* **2002**, *40*, 909–915.
- (8) Magdalena, A. B.; Lehane, M.; Krys, S.; Fernandez, M. L.; Furey, A.; James, K. J. *Toxicon* **2003**, *42*, 105–108.
- (9) Taleb, H.; Vale, P.; Amanhir, R.; Benhadouch, A.; Sagou, R.; Chafik, A. J. *Shellfish Res.* **2006**, *25*, 1067–1071.
- (10) Furey, A.; Moroney, C.; Brana-Magdalena, A.; Saez, M. J.; Lehane, M.; James, K. J. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3078–3084.
- (11) Jeong, H. J. *J. Eukaryot. Microbiol.* **1999**, *46*, 390–396.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: luis.botana@usc.es. Phone: +34 982 252 242. Fax: +34 982 252 242.

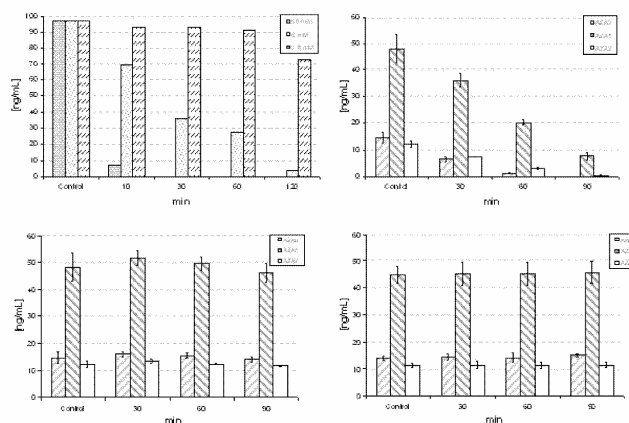
<sup>†</sup> Departamento de Farmacología, Universidad de Santiago de Compostela.

<sup>‡</sup> Marine Institute.

<sup>§</sup> University College Dublin.

<sup>||</sup> Current affiliation: Ifremer, Nantes, France.

<sup>||</sup> Departamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela.

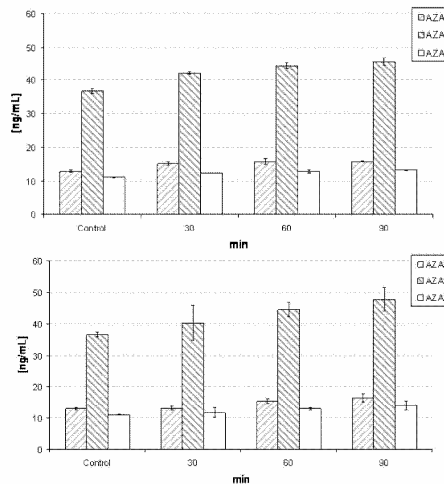


**Figure 1.** Stability of AZAs in solution and tissue when exposed to HCl. Top left: AZA1 in methanol at 37 °C with HCl (60, 6, and 0.6 mM); top right: AZA3, -1 and -2 in mussel tissue at 37 °C (on shaker) with HCl at pH 0.5; bottom left: AZA3, -1 and -2 in mussel tissue at 37 °C (on shaker) with HCl at pH 1.5; bottom right: AZA3, -1 and -2 in mussel tissue at 37 °C (on shaker) with HCl at pH 2.5; error bars represent 1 SD ( $n = 4$ ).

consumption, but other factors like their stability and bioavailability after ingestion must be considered. Temperature and pH conditions of either shellfish samples or solutions of pure toxins can affect the structure and properties of AZAs. Tissue matrices can show a protective effect against these physical conditions, which is not present when toxins are in solution. Such protection was observed when the effect of gamma irradiation in AZA1 was studied. Either naturally or spiked matrix show a protective effect against irradiation, whereas in methanol solution AZA1 concentrations decrease when irradiation increases.<sup>12</sup>

Recently AZAs-binding proteins have been isolated in shellfish samples.<sup>13</sup> Therefore, the bioavailability of these toxins can be modified by enzymes like the pepsin, involved in protein digestion in the human body. These enzymes can produce the denaturation or decomposition of the binding proteins and the release of the toxins to the medium.

The effect of the steaming of mussels on their AZAs amount is not clear. Initially an inactivation of AZAs in frozen shellfish during traditional home cooking procedures was suggested<sup>14</sup> but afterward an increase in AZA concentration after steaming of fresh mussels was obtained.<sup>15</sup> These two studies are not in contradiction if two parallel phenomena are considered in the second one: the heat degradation or conversion of the toxins and their concentration in the coagulated tissues resulting from the steaming,<sup>15</sup> but this could not be proved. In another study it was shown that the

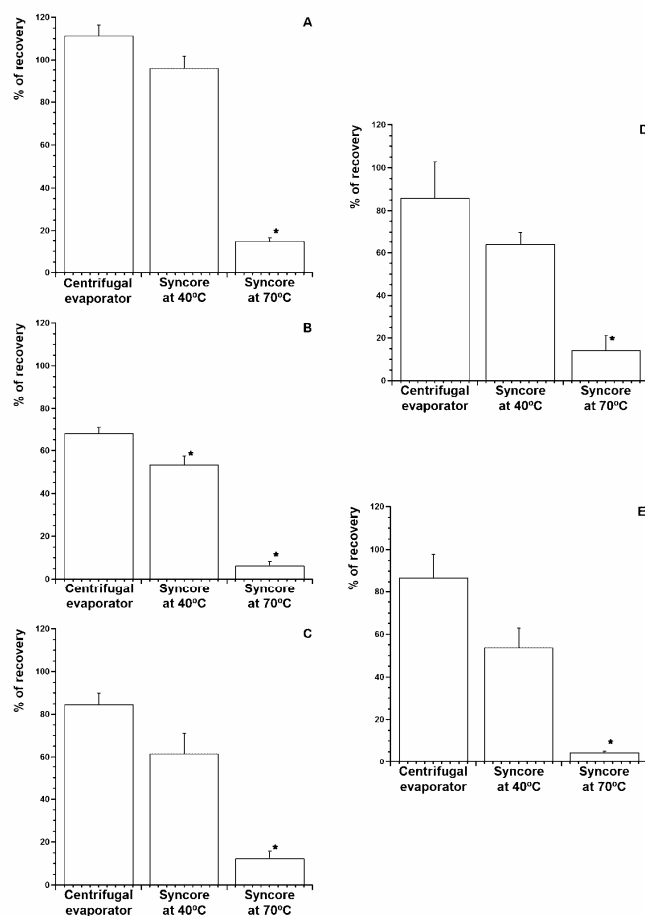


**Figure 2.** Stability of AZAs in naturally contaminated mussel tissues exposed to pepsin and mixtures of pepsin and HCl. (top) AZAs in mussel tissue at 37 °C (on shaker) after addition of pepsin only ( $27 \text{ mg L}^{-1}$ ) at pH 5.1 ( $n = 4$ , 1 SD); (bottom) AZAs in mussel tissue at 37 °C (on shaker) with HCl and pepsin ( $27 \text{ mg L}^{-1}$ ) at pH 2.3 ( $n = 4$ , 1 SD).

heat treatment of shellfish tissues at 118 °C produced the degradation of AZAs, appearing molecules whose structure could not be determined because of their low concentration.<sup>16</sup> Stability

- (12) McCarron, P.; Kotterman, M.; de Boer, J.; Rehmann, N.; Hess, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2487–2493.
- (13) Nzoughet, K. J.; Hamilton, J. T.; Floyd, S. D.; Douglas, A.; Nelson, J.; Devine, L.; Elliott, C. T. *Toxicol.* **2008**, *51*, 1255–1263.
- (14) James, K. J.; Furey, A.; Lehane, M.; Moroney, C.; Satake, M.; Yasumoto, T. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. In *Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins & Phycotoxins*, Guarujá, Brazil, May 21–25, 2000; de Koe, W. J., Samson, R. A., van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M., Eds.; 2001; pp 401–408.
- (15) Hess, P.; Nguyen, L.; Aasen, J.; Keogh, M.; Kilcoyne, J.; McCarron, P.; Anne, T. *Toxicol.* **2005**, *46*, 62–71.

- (16) Quilliam, M.; Reeves, K.; MacKinnon, S.; Craft, C.; Whyte, H.; Walter, J.; Stobo, L.; Gallacher, S. In *Proceedings of the 5th International Conference of Molluscan Shellfish Safety*, Galway, Ireland, June 14–18, 2004; Deegan, B., Butler, C., Cusack, C., Henshilwood, K., Hess, P., Keaveney, S., McMahon, T., O'Connell, M., Silke, J., Eds.; Marine Institute: Galway, Ireland, 2006.



**Figure 3.** Effect of evaporation temperature on stability of AZAs in acidic, methanolic extracts. Extracts of MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (700/300/1) contaminated with one AZA analogue were divided in four aliquots, one of them was measured by LC/MS and the other three were vacuum-dried using different temperature conditions, one in the centrifugal evaporator and the other two in the Syncore at 40 and 70 °C, respectively. The three last were resuspended in methanol and measured by LC/MS. Results are represented as % of recovery of each analogue in each one of the dried aliquots with respect to the aliquot that was not dried. Mean  $\pm$  SEM of at least three experiments. \* Significant differences between percentages of recovery in each temperature condition (A, extracts contaminated with AZA1; B, with AZA2; C, with AZA3; D, with AZA4; and E, with AZA5).

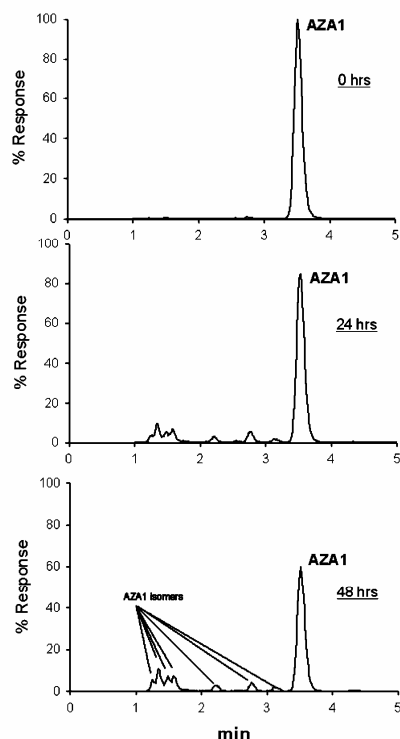
of AZAs stored during 8 months at various temperatures in different mussel matrixes has been also studied, concretely at  $-20$  °C,  $+4$  °C,  $+20$  °C, and  $+40$  °C in wet-frozen homogenate and freeze-dried material. In these conditions no degradation of AZA1 and AZA2 was detected. Nevertheless, AZA3 increases and shows degradation most rapidly at higher temperatures in the wet homogenate whereas these changes were only notable at  $+20$  °C and  $+40$  °C in the short term in freeze-dried material.<sup>17</sup>

The aim of this work is to study the influence of temperature and pH in AZAs concentration, either in extracts of pure toxins or in shellfish. The behavior of AZAs in media with different pH

and temperature conditions has been determined, together with the effects of an acidic pepsin solution that simulates the human gastric juice. The results of all these experiments can be used to improve methods for the purification of AZAs from biological matrixes, for the purpose of toxicological studies or reference material production.

#### EXPERIMENTAL SECTION

**Chemicals.** At the University of Santiago de Compostela (USC) acetone, methanol, and acetonitrile were from Panreac (Spain). Formic acid was from Merck (Spain). Ammonium



**Figure 4.** Chromatograms of AZA1 during treatment with 40 mM formic acid. Top: original untreated solution. Middle: 24 h at room temperature. Bottom: 48 h at room temperature. Concentration of AZA1 decreases with increasing isomerization. The monitored mass is  $m/z$  842 (AZA1).

formate was from Fluka (Switzerland). Water with a high degree of purity was obtained by a prepurification filter system followed by the water purification system Arium 611 from Sartorius (Germany).

Seven-day-old Swiss Mice were obtained from the animal care facilities of the USC. The experimental procedures with animals were approved by the USC bioethical committee. Plastic tissue-culture dishes were purchased from Falcon (Madrid, Spain). Foetal calf serum was from Gibco (Glasgow, U.K.) and Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) was from Biochrom (Berlin, Germany). All the other compounds were from Sigma (Spain). AZA1, AZA2, AZA3, AZA4, and AZA5 standards were kindly provided by Dr. M. Satake (Japan).

At the Marine Institute (MI), solvents (MeOH, acetonitrile) were bought from Labscan (Dublin, Ireland). All other acids, buffers, and chemicals were bought from Sigma-Aldrich (Ireland). AZA1 was obtained from NRCC as certified standard for use as calibrant and in stability trials.

**Instruments.** • Evaporators (USC): Büchi Syncore Systems for Parallel Evaporation (from Büchi, Switzerland) and centrifugal evaporator RC 10 09 (from Jouan, France).

• LC/MS system (USC): HPLC system Shimadzu, which consists of two pumps (LC-10ADvp), autoinjector (SIL-10ADvp) with refrigerated rack, degasser (DGU-14A), column oven (CTO-10ACvp) and system controller (SCL-10Avp), coupled to a QTRAP LC/MS/MS system (from Applied Biosystems, U.S.A.), which consists of a hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometer equipped with an API fitted with an ESI source. Nitrogen generator NM20ZA (from Peak Scientific, U.S.A.).

• LC/MS system (MI): Q-ToF Ultima mass spectrometer (Micromass, U.K.) coupled to a 2796 HPLC system (Waters, Ireland).

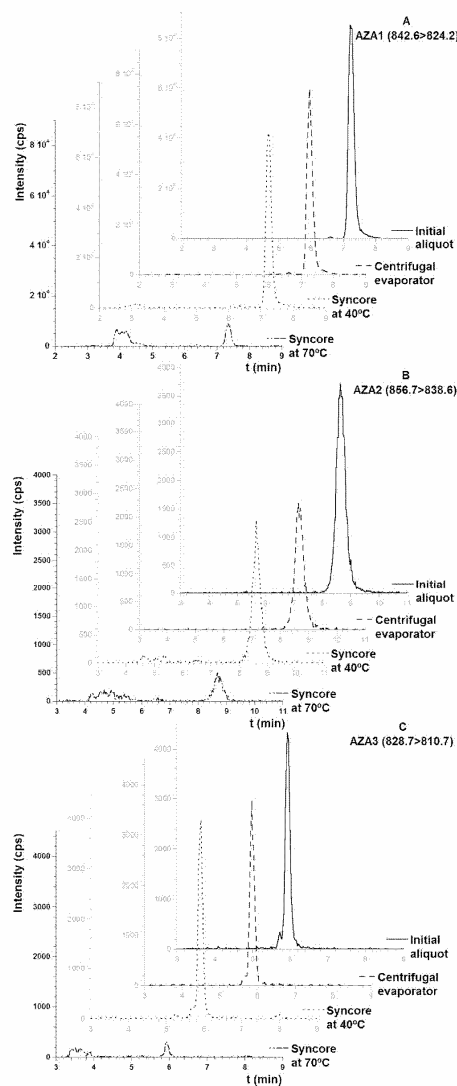
**LC/MS Analysis at the University of Santiago de Compostela (USC).** Separation between toxins was achieved in a BDS-Hypersil C8  $3\ \mu\text{m}$  ( $50 \times 2\ \text{mm}$ ) column (from Phenomenex, U.S.A.) with a  $10 \times 2.1\ \text{mm}$  guard cartridge (from Thermo, U.S.A.), inside the column oven at  $25\ ^\circ\text{C}$ . Injection volume was  $5\ \mu\text{L}$ . Mobile phase consisted of 100% water with 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid in pump A and acetonitrile:water (95:5) with 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid in pump B. Analyses were carried out using a linear gradient elution with a constant total flow of  $0.2\ \text{mL min}^{-1}$  and a run time of 14 min. In each run %B started at 30%, achieving 90% in 8 min; these conditions held during 3 min (90%B and 10%A); %B decreased to 30% at 11.5 min, and this composition was maintained until the next run. Analyst software was used to control the instrument, process the data, and analyze them.

Samples were analyzed with the ESI interface operating in positive mode, using the following parameters: curtain gas: 15; CAD gas: 6; IonSpray voltage: 4000; temperature: 450; gas 1:50; gas 2:50; these parameters had been previously optimized using AZAs standards. The mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring (MRM), analyzing two product ions per compound: one for quantification and the other for confirmation. Transitions selected were: AZA1,  $842.6 > 824.2/806.1$ ; AZA2,  $856.7 > 838.6/820.6$ ; AZA3,  $828.7 > 810.7/792.7$ ; AZA4 and AZA5,  $844.5 > 826.6/808.7$ . Quantification was done with the most abundant ion in the fragment spectra: 824.2 (AZA1), 838.6 (AZA2), 810.7 (AZA3), and 826.6 (AZA4 and AZA5).

**LC/MS Analysis at the Marine Institute (MI).** LC/MS Analysis of HCl Treated Samples (in Solution and in Tissue Mixtures). LC separation was achieved using a gradient run using a BDS Hypersil C8  $3\ \mu\text{m}$  ( $50 \times 2\ \text{mm}$ ) column (from Keystone, U.S.A.) with a  $10 \times 2.1\ \text{mm}$  guard cartridge (from Thermo, U.S.A.) at a flow rate of  $250\ \mu\text{L min}^{-1}$ . The same binary mobile phase as described in the previous section was used. The gradient was set to run from 30% B to 90% B in 9 min holding for a further 3 min. The MS was operated in positive mode using a cone voltage of 40 V and collision energy of 50 eV. The monitored traces in SIM mode were  $m/z$  828.5 (AZA3),  $m/z$  842.5 (AZA1, AZA6), and  $m/z$  856.5 (AZA2).

**LC/MS Analysis of AZA1 Treated with Different Mobile Phases.** Separation was achieved on an ACE C18 column ( $2.1\ \text{mm} \times 30\ \text{mm}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ ). An isocratic flow of 40% A and 60% B was run at  $250\ \mu\text{L min}^{-1}$  (same binary phase as described above). The samples were analyzed in positive ionization mode with a cone voltage of 40 V and collision energy of 50 eV. The monitoring runtime was

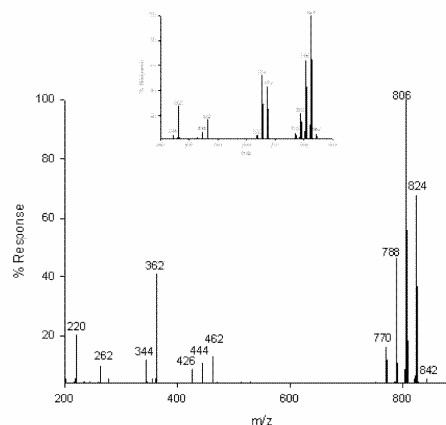
*Analytical Chemistry*, Vol. 80, No. 24, December 15, 2008 9675



**Figure 5.** Effect of temperature on the isomerization of AZA1 to –3 during evaporation of acidic methanolic extracts (chromatograms of one representative extract contaminated with each AZAs analogue A, AZA1; B, AZA2; C, AZA3). The chromatograms obtained by LC/MS for the four aliquots of one of the extracts contaminated with each one of the AZAs analogues are represented, showing only the mass transition used for quantification and the time period in which appear the peaks of each compound.

set to 6 min. AZA1 eluted at around 3.6 min. Some samples were reanalyzed for isomerization peaks using a gradient system

9676 Analytical Chemistry, Vol. 80, No. 24, December 15, 2008



**Figure 6.** Mass spectrum of AZA isomers formed after treatment with formic acid (40 mM). The common AZA1 fragment of  $m/z$  672 is missing. The ion ratio of the first water loss fragments is shifted toward the  $m/z$  806 fragment, while AZA1 exhibits  $m/z$  824 as the most abundant fragment. Inset: mass spectrum of AZA1.

running from 30% B to 90% B in 9 min holding at 90% for further 3 min at a flow rate of  $250 \mu\text{L min}^{-1}$ .

**Stability of AZA1 in HCl-Treated Methanolic Solution (MI).** Aliquots ( $50 \mu\text{L}$ ) of AZA1 solution ( $1.49 \mu\text{M}$ ) were dried down under a gentle stream of nitrogen at room temperature, and taken up in  $500 \mu\text{L}$  of methanolic HCl solutions of different strengths (60 mM, 6 mM, and 0.6 mM). The samples were heated to  $37^\circ\text{C}$  in a heater block for a defined time span (10 min, 30 min, 60 min, and 120 min). The reaction was stopped by addition of  $500 \mu\text{L}$  of equal strength NaOH. A blank sample was run using only methanol to add to the toxin.

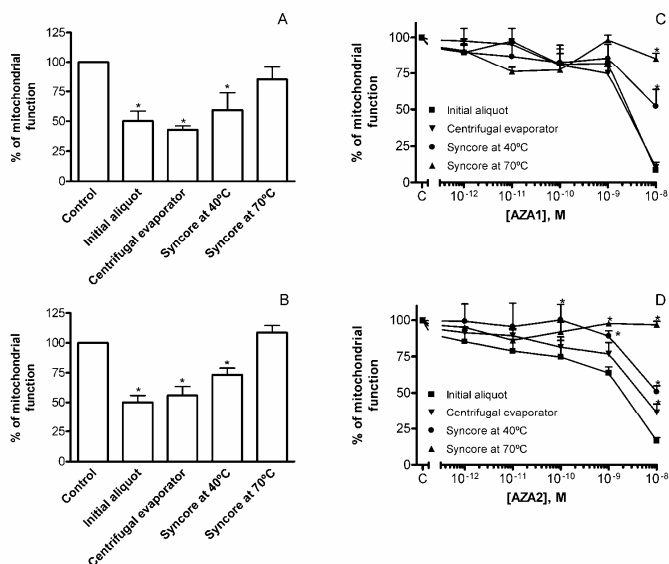
**Stability of AZAs in Different Mobile Phase Conditions (MI).** Several aliquots ( $50 \mu\text{L}$ ) of pure AZA1 solution ( $1.49 \mu\text{M}$ ) were dried in  $1.5 \text{ mL}$  HPLC vials. The dry toxins were then dissolved in different mixtures ( $1 \text{ mL}$ ) of potential mobile phases. The mobile phases contained the following:

- 100% methanol
- 100% acetonitrile
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 40 mM formic acid
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 2 mM ammonium formate
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 2 mM ammonium formate and 40 mM formic acid
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 0.1% AcOH
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 5 mM ammonium acetate
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 50 mM ammonium hydroxide
- ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v 50 mM sodium hydroxide

The samples were left at room temperature as well as at  $45^\circ\text{C}$  for durations of 24 and 48 h.

**Stability of AZAs in Mussel Tissue Mixed with HCl (MI).** Aliquots of a homogenized and well characterized mussel tissue reference material (in house LRM) were weighed in 2 g portions and 2 mL of HCl solution of different strengths (1 M, 0.1 and 0.01 M) was added to the homogenate. The tissue with the





**Figure 7.** Effect of different AZAs extracts on neuronal cell death as determined with the MTT assay. Left: Effect after 24 h of exposure of cultured neurons to the toxins. Cultured neurons were exposed to the four aliquots of representative extracts contaminated with AZA1 (A) and AZA2 (B), all of them diluted by the same factor, corresponding with 25 nM of the toxin in the initial aliquot. Mean  $\pm$  SEM of five independent experiments, each performed in duplicate. \* Significant differences between percentages of mitochondrial function in each temperature condition, with respect to the control. Right: Effect after 48 h of exposure of cultured neurons to the toxins. Cultured neurons were exposed to different concentrations of the four aliquots of representative extracts contaminated with AZA1 (C) and AZA2 (D), all of them diluted by the same factor. Toxin concentrations were calculated for the initial aliquot of each extract. Mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, each performed in duplicate. \* Significant differences between percentages of mitochondrial function in each temperature condition, with respect to the initial aliquot.

additional acid was vortex mixed for 2 min. The samples were placed into an oven at 37 °C onto a shaking plate adjusted to 105 rpm. The aliquots were taken out of the oven at time points of 30, 60, and 90 min, and the acid was immediately neutralized using NaOH solution (2 mL) of equal strength. Further 2 min of vortex mixing assured the complete neutralization of the acid. To test for heat degradation a blank sample only containing LRM and water (2 mL) was left in the oven for 90 min while a duplicate was prepared and not subjected to heat.

The samples were then extracted using a double extraction of 2  $\times$  9 mL methanol vortex mixing for 2 min for the first extraction and using an ultra turrax mixer for 2 min for the second extraction. The extracts were each separated from the tissue using centrifugation at 4000 rpm for 10 min. The decanted solution was transferred into a 25 mL volumetric flask and filled to the mark using methanol. The extracts were filtered through a 0.2  $\mu$ m filter and analyzed by LC/MS.

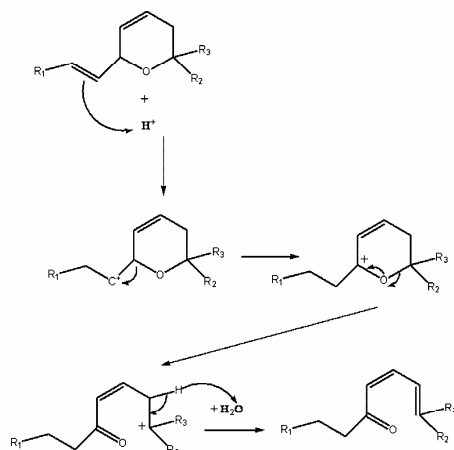
**Stability of AZAs in Mussel Tissue in Simulated Gastric Juice (MI).** HCl solutions (0.1 and 0.01 M) were made up to contain 27 mg L<sup>-1</sup> of pepsin. In addition a solution of 27 mg L<sup>-1</sup> of pepsin in water was also made up. The pH of this solution was adjusted to 5 using HCl. The shellfish tissue samples were treated in the same manner as described in the previous experiment.

**Mussel Samples Used for Heat Treatment (USC).** Mussels were collected in Ireland following a toxic episode (occurrence

of OA, DTXs, and AZAs) in 2005. The whole flesh tissue was removed from the shell, without using heat treatments, and was subsequently stored frozen until further treatments.

Samples were defrosted, interstitial liquid was collected, and digestive glands were carefully separated from the rest of the meat using clamps and scissors. Meat and liquid were mixed and homogenated. Two portions (A and B) of this mixture were collected, having the same mass and homogeneous characteristics. Previously to the extraction, portion B was sealed and heated in a water bath at 90 °C during 10 min. A or B (previously heated) was mixed with acetone and filtered. The extract (sample 1) was collected and vacuum-dried, and the residue was mixed with methanol twice and filtered. These two extracts (samples 2 and 3) were mixed and vacuum-dried. Finally samples 1, 2, and 3 were mixed and named as sample 4. Sample 4 from portion A and sample 4 from portion B were analyzed by LC/MS to determine their AZAs concentration. Before being injected in the LC/MS system, they were evaporated to dryness, resuspended in methanol, and filtered through 0.45  $\mu$ m filters (Ultrafree-MC centrifugal filter devices from Millipore, Spain).

**Evaporation of AZAs in Acidic Solutions Using Different Temperature Conditions (USC).** Effect of temperature in various extracts of AZAs was investigated. The extracts were obtained by preparative HPLC. The medium was MeOH/H<sub>2</sub>O/



**Figure 8.** Proposed rearrangement reaction of ring A of Azaspiracid after treatment with formic acid (40 mM) resulting in a ketone at C6.

AcOH (700/300/1) and each extract contained one of each AZA analogue (AZA1 to AZA5). We tested 11 extracts with AZA1 (from 455 to 2120 ng/mL), 8 extracts with AZA2 (from 143 to 624 ng/mL), 7 extracts with AZA3 (from 25.6 to 194 ng/mL), 3 extracts with AZA4 (from 21.2 to 41.8 ng/mL), and 4 extracts with AZA5 (from 78.5 to 197 ng/mL). To study the stability of AZAs in this medium at different temperatures, each extract was divided in four homogeneous aliquots. One of them was directly quantified by LC/MS to determine the original amount of AZAs. The second one was vacuum-dried in a centrifugal evaporator at room temperature. The third and the fourth were evaporated until dryness in a Büchi Syncore Systems for Parallel Evaporation, maintaining aliquots at 40 and 70 °C, respectively. After drying, these three last aliquots were reconstituted to the initial volume with methanol, and their AZAs concentration was measured by LC/MS.

**Cell Cultures (USC).** Primary cultures of cerebellar granule cell were obtained from cerebella of 7-day-old mice as previously described.<sup>18–20</sup> In brief, cells were dissociated by mild trypsinization at 37 °C, followed by trituration in a DNase solution (0.004% w/v) containing a soybean trypsin inhibitor (0.05% w/v). The cells were suspended in DMEM containing 25 mM KCl, 31 mM glucose, and 0.2 mM glutamine supplemented with p-amino benzoate, insulin, penicillin, and 10% fetal calf serum. The cell suspension was seeded in 96-multiwell plates precoated with poly-L-lysine and incubated for 8–11 days in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95%

air atmosphere at 37 °C. Cytosine arabinoside, 20 μM, was added before 48 h in culture to prevent glial proliferation.

**Cell Viability Assays (USC).** Experimental solutions were based on Locke's buffer containing (in mM) 154 NaCl, 5.6 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5.6 glucose, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, and 10 HEPES, pH 7.4 adjusted with Tris before addition to the cells. The cytotoxic action of AZAs was studied in cultured cerebellar neurons by the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test. The MTT assay was performed as described previously.<sup>19,20</sup> This test, which measures mitochondrial function, was used to assess cell viability as it has been shown that in neuronal cells there is a good correlation between a drug-induced decrease in mitochondrial activity and its cytotoxicity.<sup>21</sup> Acidic solutions containing AZA1 and AZA2 evaporated using different temperature conditions (see on previous section) were tested by MTT assay. Briefly, after 24 or 48 h of exposure to different concentrations of toxins, cells were rinsed and incubated for 30 min with a solution of MTT (500 μg/mL) dissolved in Locke's buffer. After washing off excess MTT the cells were disaggregated with 5% sodium dodecyl sulfate, and the colored formazan salt was measured at 590 nm in a spectrophotometer plate reader.

**Data Analysis.** All the experiments were carried out at least three times by duplicate. Data were normalized and results were expressed as means ± SEM. Results were analyzed using the Student's *t* test or the analysis of variance (ANOVA) test. A probability level of 0.05 or less was used for statistical significance.

## RESULTS

**Stability of AZA1 in Strong Acidic Solutions (HCl).** AZA1 is easily degraded in methanolic solutions of HCl (Figure 1, top left). At 60 mM HCl and slightly elevated temperature (37 °C), it only takes 30 min to completely destroy AZA1. Lower concentrations of HCl show similar effects; however, the reaction takes more time, suggesting that both acid and temperature aid the reaction. Concentrations of HCl are given rather than the pI as the pI is not defined in organic solvents. The concentrations of 60, 6, and 0.6 mM equate to about pH 0.5, 1.5, and 2.5 in aqueous medium, respectively.

**Stability of AZA1 Exposed to Different Mobile Phases.** Exposure to formic acid over 48 h resulted in an about 50% loss in concentration. While 80% of the initial concentration was still present in the 24 h sample, the sample that was left for an equal amount of time at 45 °C showed a complete absence of toxin. A similar outcome was observed in samples treated with sodium hydroxide. Samples treated with formic acid and ammonium formate degraded at a slower rate as observed in samples with formic acid alone. Only samples subjected to heating showed a strong degradation of AZA1 in this case. The slower degradation is most likely a result of the buffering behavior of the ammonium formate. The detrimental effect by the strong base (NaOH) was not observed in samples that were treated with ammonium hydroxide. Although heating to 45 °C resulted in some loss of the toxin after 48 h, no significant change in concentration was observed within the first 48 h at room temperature.

**Stability of AZA1, 2, and 3 in Tissues Exposed to Strong Acid (HCl).** The rapid degradation of AZA1 during exposure to strong acid prompted us to study the stability of AZAs when

(17) McCarron, P.; Enteborg, H.; Hess, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2475–2486.

(18) Schousboe, A.; Meier, E.; Drejer, J.; Hertz, L. In *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*; Shahar, A., de Vellis, J., Vemadakis, A., Haber, B. P. P., Eds.; Alan R. Liss: New York, 1989; pp 203–206.

(19) Vale, C.; Fonfria, E.; Bujons, J.; Messeguer, A.; Rodriguez-Farre, E.; Sunol, C. *Neuroscience* **2003**, *117*, 397–403.

(20) Vale, C.; Nicolaou, K. C.; Frederick, M. O.; Gomez-Limia, B.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 356–363.

(21) Varming, T.; Drejer, J.; Frandsen, A.; Schousboe, A. *J. Neurosci. Res.* **1996**, *44*, 40–46.

present in shellfish tissues (Figure 1 top right, bottom left and right). Shellfish tissue mixed at a ratio of 1:1 with 60 mM HCl showed about 80% degradation of AZA1, 2, and 3 after 90 min at 37 °C. However, when HCl of 6 and 0.6 mM was used, there was no degradation over the same period, suggesting that the matrix significantly protects AZAs from the acid.

**Stability of AZAs in Mussel Tissue in Simulated Gastric Juice.** A significant increase in toxin concentration was observed in samples treated only with pepsin solution (Figure 2). The concentration of AZA1 rose from 37 ng/mL<sup>-1</sup> to about 45 ng/mL<sup>-1</sup>, or 28%. Samples treated with HCl and pepsin at pH 2.3 also showed a significant increase in toxin concentration (30%) with time (90 min).

**Stability of AZAs during the Evaporation of Acidic Methanolic Extracts Using Different Temperature Conditions.** Although AZA1 showed some stability toward evaporation at room temperature and at 40 °C, all other combinations of evaporation conditions and analogues (AZA1–5) led to degradation or poor recovery of the analogues (Figure 3). Recoveries at room temperature, 40 and 70 °C ranged from 68 to 111%, from 53 to 96%, and from 4 to 15%, respectively. The difference between 40 and 70 °C was particularly marked and statistically significant for all analogues (including AZA1). Moreover AZA2 was the analogue with lower recoveries in each one of the temperature conditions tested.

**Degradation Products of AZAs in Acidic Media.** Samples that had been treated with formic acid showed a significant decrease of AZA1, but the appearance and gradual increase of other, earlier eluting peaks in the AZA1 trace indicated a reaction with the toxins (Figure 4).

Formation of similar isomers was independently observed at USC during the evaporation of methanolic extracts containing acetic acid. Each one of these extracts contained one of the AZAs analogues (from AZA1 to AZA5) and the formation of isomers was observed at 40 and 70 °C (from AZA1 to AZA3 in Figure 5, AZA4 and AZA5 not shown).

The isomers formed during formic acid exposure possessed MS-spectra that largely correlated with the spectrum of AZA1 (Figure 6). The four earliest eluting peaks showed identical mass spectra to the main toxin with the only difference being the absence of fragment ions of  $m/z$  672 and the consecutive water losses.

**Effect of Temperature on AZAs in Shellfish Matrix.** In the previous experiments with the extracts, a significant destruction of AZAs was shown at 70 °C; therefore, it was interesting to investigate if this behavior was the same when the toxins were in the shellfish matrix. To perform this assay, two homogeneous portions (A and B) of the same mussel sample were collected, and one of them (B) was heated at 90 °C for 10 min. After the heat treatment, the two aliquots followed the same extraction procedure, obtaining two final samples (one from each of the portions), which were measured by LC/MS (data not shown). AZAs concentrations in the preheated sample were lower than in the other one, but differences between them were not significant, except for AZA2.

**Cytotoxicity of Acid-Treated Extracts.** The toxicity of different aliquots of the extracts from the evaporation study was examined to investigate if the degradation products were toxic or not. Two extracts were selected for this part of the study: one

with AZA1 and another with AZA2; the other analogues could not be tested because of their low concentration in the extracts. The toxicity in primary cultures of cerebellar granule cells was first tested in a 24 h assay (Figure 7A,B). The mitochondrial function, directly correlated with cell viability, was significantly reduced for the initial aliquot (prior to evaporation) and the aliquot evaporated in a centrifugal evaporator, suggesting that significant toxicity was observed for both AZA1 and –2 in these extracts. Mitochondrial function increased, compared to the initial extract, in aliquots dried in the Syncore at 40 °C and about 100% of cell viability was observed in aliquots dried at 70 °C. Thus, it appeared that the degradation of the AZAs largely results in transformation to non-toxic compounds. To confirm this conclusion, a further experiment was done with the same cellular model and 48 h of incubation time. The aliquots in the 48 h assay had the same AZA1 and AZA2 concentrations as in the previous 24 h assay (Figure 7C,D). Although the toxicity only appears for the most concentrated samples, the effect of the drying temperature is again observable as well as the differences between AZA1 and AZA2.

## DISCUSSION

The stability of AZAs has been shown to be related to three major factors: pH, temperature and medium (shellfish tissue or solution).

The largest impact on AZAs was observed by exposing AZAs to acid in solution (methanol, aqueous methanol, or aqueous acetonitrile), Figure 1 and 3 to 6. Among exposures to different pH, the conditions with the greatest effects were very low and very high pH, using HCl and NaOH, respectively. In both cases, AZAs were destroyed within minutes from the initial exposure, even at room temperature. While lightly basic conditions (ca. pH 9) did not affect AZAs significantly, lightly acidic conditions using either formic acid or acetic acid led to significant decomposition and rearrangement of AZAs.

A reaction mechanism is proposed for the acid-catalyzed degradation of AZA1, based on attack of the double bond between C4 and 5, resulting in the opening of ring A and ketone formation at C6 (Figure 8). This rearrangement results in a degradation product of the same molecular mass as AZA1, which explains that the AZA-degradation products can be seen in chromatograms monitoring the molecular ion traces of AZA1 (Figures 4 and 5). The mechanism also explains the lack of A-ring fragmentation, which is seen in the collision induced mass spectrum of the degradation product (Figure 6) as a lack of the fragment ion cluster ( $672 > 654 > 636$ ), normally present in the AZA1 ToF-MS fragmentation spectrum.<sup>5</sup> Further studies, based on NMR, would be required to definitively assign a structure to the rearrangement products. However, it is unlikely that sufficient compound can be obtained for these studies in the near future because of scarce events and complex synthetic procedures.

While HCl led to destruction of AZA1 in methanol within 30 min, formic acid was similarly effective, and degradation was obvious even at room temperature. However, the degradation with formic acid required a longer time frame (24 to 48 h) compared with HCl (30 min). Acetic acid was less effective in the destruction of AZA1 as degradation of AZAs was only observed following evaporation (i.e., increase in concentration) and heat treatment at 40 or 70 °C. This difference in effectiveness is consistent with the difference in acidity of the three acids studied ( $pK_a = 3.7$  and

4.8 for formic and acetic acid, respectively, HCl being a strong inorganic acid,  $pK_a$  is not defined but  $<0$ ).

The instability of AZAs in acidic solutions is of particular importance for the procedures used in the preparative isolation of AZAs. Analytical separations of AZAs may easily use formic acid in the mobile phase, as degradation under HPLC conditions is very reproducible and can thus be accounted for through standardization of conditions. However, in preparative isolations, the absolute amount of compound obtained is the most important parameter, and degradation due to the use of acidic mobile phases that need to be evaporated is not acceptable. Previous isolation studies of AZAs have consistently used steps involving elution of AZAs with a mobile phase containing acetic acid.<sup>3,4,22–24</sup> The use of acid in preparative chromatography of AZAs should be avoided through the use of neutral or lightly basic mobile phases. If acid is required for reasons of peak-shape and selectivity, acid-catalyzed degradation should be reduced through freeze-drying of fractions rather than heated evaporation or through neutralization prior to evaporation.

In shellfish tissues, AZAs seem to be efficiently protected from a range of acidic conditions, at temperatures up to 37 °C (Figure 1). Although acid seems to have detrimental effects on AZAs in solution, the shellfish matrix has a protective effect on AZAs, and mixtures of AZA-contaminated tissues with HCl at concentrations resulting in pH 2.3 were not effective in reducing the levels of AZA (Figure 2). This protective effect could be due to the buffering ability of the shellfish tissue. On the other hand, levels of AZAs even increased when shellfish tissues were treated with pepsin (an enzyme typically involved in protein digestion in the human body), suggesting that AZAs are bound to proteins in shellfish tissues and released when these proteins are decomposed or denatured. This finding is in agreement with the recent finding by Nzoughet et al.,<sup>13</sup> who have isolated such AZA-binding proteins in the range from 22 to 45 kDa. Again, both our study and the study by Nzoughet et al.<sup>13</sup> underpin the hypothesis that the increase in AZAs observed upon cooking by Hess et al.<sup>15</sup> is related to protein-binding of AZAs. A similar protective effect of shellfish tissues was observed in the gamma-irradiation of AZAs in solution and shellfish tissue,<sup>12</sup> although it has not been clarified what the mechanism of this protection is.

While heat treatment plays a major role in the evaporation of acidic solutions, the study of naturally contaminated tissues suggest that temperature has a rather small effect on AZAs in shellfish matrix, as only some degradation of AZA2 was observed at 90 °C, whereas 70 °C was sufficient to lead to severe degradation of all 5 AZAs examined. These results corroborate the previously reported study on the heat stability of AZAs relative to cooking procedures,<sup>15</sup> and other heat treatments,<sup>23,25</sup> confirm-

ing that typical commercial procedures for processing of mussels and home cooking are not effective in significantly reducing levels of AZAs in shellfish.

The reduced cytotoxicity observed in the extracts after evaporation of the acidic solutions clearly suggests that the acid degradation products are likely to be less potent than the parent compounds and some major shellfish metabolites. Following a study by Ito et al., on the stereospecificity of natural and synthetic AZA analogues, a paper by Vale et al.<sup>20</sup> showed that AZA-toxicity is specifically related to the stereochemistry of the ABCD-region of the molecule. Therefore, the mechanism proposed for the rearrangement is consistent with reduced toxicity as the acid-catalyzed reaction severely affects the stereochemistry of AZAs at the A-ring through ring-opening.

While this finding potentially opens routes for decontamination of shellfish through acid treatments, it is doubtful whether live shellfish can be exposed to acid at concentrations relevant to either breaking the protein bonds or leading to the direct degradation of AZAs at low pH. However, the findings of acid-instability and reduced toxicity of the acid-rearrangement products point toward remaining questions regarding the pharmacokinetics of AZAs in humans. The conditions studied are relevant to human digestion where HCl and pepsin are mixed with food in the stomach. Our results here show that above pH 1.5, the most acidic condition that would be typically observed in the human stomach, AZAs are not destroyed by acid through protection of the shellfish matrix, even for 2 h exposure at 37 °C. This result should be further investigated in animals to verify that our *in silico* study can reflect the human condition. Furthermore, our results, in conjunction with the findings by Nzoughet et al.,<sup>13</sup> open the question of bioavailability of AZAs during human digestion processes. In particular the question remains whether AZAs, being bound to shellfish proteins, can only act at the surface of the digestive tract, or whether they can also be absorbed into the blood stream to yield toxic effects similar to the multiple organ damage in mice described by Ito et al. Further studies will be required to answer these questions, which are important to risk assessment.

#### ACKNOWLEDGMENT

The first two authors contributed equally to this work. This work was funded with grants from the following agencies: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Grants AGL2006-08439/ALI, AGL2007-60946/ALI. Xunta de Galicia, Spain: PGIDIT04TAL26-1005PR, GRC 2006/30, PGIDIT07MMA006261PR. EU Vth Frame Program; Grants IP FOOD-CT-2004-06988 (BIOCOP), STREP FOOD-CT-2004-514055 (DETECTOX), STREP FOOD-CT-2004-514074 (BIOTOX), and CRP 030270-2 (SPIES-DETOX). C.A. was funded with fellowship MEC AP-2004-5731. N.R. was funded through the ASTOX project (Marine Institute and National Development Plan (NDP) (ST/02/02, 2003-2006)). C.B.W. is recipient of a predoctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brazil.

Received for review July 18, 2008. Accepted October 20, 2008.

AC801506D

- (22) Ofuji, K.; Satake, M.; McMahon, T.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 740–742.
- (23) Hess, P.; McCarron, P.; Rehmann, N.; Kilcoyne, J.; McMahon, T.; Ryan, G.; Ryan, M. P.; Doucette, G. J.; Satake, M.; Ito, E.; Yasumoto, T. *Mar. Env. Health Series* **2007**, *28*.
- (24) Alfonso, C.; Alfonso, A.; Otero, P.; Rodríguez, P.; Vieytes, M. R.; Elliot, C.; Higgins, C.; Botana, L. M. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *865*, 133–140.
- (25) McCarron, P. University College Dublin, Dublin, Ireland, 2008.
- (26) Ito, E.; Frederick, M. O.; Koftis, T. V.; Tang, W.; Petrovic, G.; Ling, T.; Nicolaou, K. C. *Harmful Algae* **2006**, *5*, 586–591.
- (27) Ito, E.; Satake, M.; Ofuji, K.; Higashi, M.; Harigaya, K.; McMahon, T.; Yasumoto, T. *Toxicon* **2002**, *40*, 193–203.

### **3.2. Resumen.**

#### **Publicación I.1. Cuantificación de la yessotoxina empleando la técnica de la polarización de la fluorescencia y estudio del procedimiento de extracción adecuado.**

La yessotoxina (YTX) es una toxina etérea policíclica producida por microalgas del fitoplancton del grupo de los dinoflagelados. Se ha demostrado que la YTX aumenta la actividad de las fosfodiesterasas específicas de nucleótidos cíclicos 3',5' (PDEs) y que existe una unión entre estas proteínas y la toxina. La polarización de la fluorescencia (FP) es una técnica espectroscópica que se puede utilizar para estudiar interacciones entre moléculas. Se basa en excitar una molécula fluorescente con luz polarizada en un plano y medir el grado de polarización de la luz emitida. En este trabajo la FP se aplica al estudio de la interacción entre la YTX y las fosfodiesterasas I y II (PDE I y II). Las fosfodiesterasas se marcan con un derivado reactivo de la fluoresceína y se mide la FP del conjugado proteína-marcador cuando se incrementa la concentración de YTX en el medio. Los resultados muestran que en ambos casos la polarización de la fluorescencia de los conjugados disminuye cuando se unen a la YTX. Si se utiliza la PDE I es posible trazar una curva gaussiana o una línea recta que relacione las dos variables (FP y concentración de YTX). La concentración de esta toxina en extractos de mejillón contaminados de manera artificial (que contienen el conjugado) se puede cuantificar midiendo su FP y utilizando las ecuaciones de dichas líneas. En este estudio se probaron distintos métodos de extracción y se determinó cuáles de ellos se podían utilizar para obtener un extracto de mejillón adecuado para ser cuantificado mediante esta técnica.

#### **Publicación I.2. Métodos de extracción y limpieza para detectar yessotoxinas en mejillones contaminados.**

La yessotoxina (YTX) y sus análogos son un grupo de toxinas descrito recientemente y con mayor presencia en moluscos en los últimos años. Se pueden cuantificar mediante varios ensayos funcionales debido a su interacción con las

fosfodiesterasas (PDEs). Uno de ellos detecta la unión entre la YTX y la PDE I marcada con un derivado fluorescente usando la polarización de la fluorescencia, una técnica espectroscópica basada en excitar una molécula fluorescente con luz polarizada en un plano y medir el grado de polarización de la luz emitida. El objetivo de este estudio fue desarrollar un procedimiento de extracción de mejillones que no interfiera con este método de detección. Se midieron las concentraciones de YTX en extractos de mejillón contaminado de manera artificial, obtenidos utilizando distintos métodos de extracción y procedimientos de limpieza. Con estas concentraciones se calcularon los porcentajes de recuperación de la toxina en varios pasos de dichos procedimientos. Se utilizaron seis métodos de extracción y dos procedimientos de limpieza y sólo con dos combinaciones no se observaron interferencias debido a la matriz de procedencia y se obtuvieron elevadas recuperaciones de toxina. Una de estas combinaciones emplea acetona como disolvente de extracción seguida de tres particiones con diclorometano y la otra utiliza metanol. El procedimiento de limpieza incluye un cartucho de sílica y un filtro para pesos moleculares menores de 10000. Por último, se aplicaron estos dos métodos de extracción-limpieza-detección a una muestra de mejillón contaminada procedente de una marea roja y los resultados muestran que no sólo se puede cuantificar la YTX, sino también la homoYTX y la hidroxYTX, con un 85-90% de recuperación.

### **Publicación II.1. Purificación de cinco azaspirácidos a partir de muestras de mejillón contaminado con toxinas DSP y azaspirácidos.**

Las intoxicaciones humanas durante los episodios tóxicos en moluscos son una preocupación muy importante para la salud pública, así como para los intereses económicos de las regiones productoras. Aunque inicialmente cada toxina se circunscribía a una región geográfica determinada, hoy en día muchas de ellas aparecen en múltiples lugares a lo largo del planeta. Además se están aislando e identificando más compuestos tóxicos (nuevas toxinas o nuevos análogos de toxinas conocidas), que representan nuevos riesgos para la salud humana. Un ejemplo de esta situación es el grupo de los azaspirácidos (AZAs). Inicialmente estas toxinas se

circunscribían a las costas irlandesas pero hoy en día aparecen en muchas localizaciones geográficas diferentes; en el primer episodio tóxico se aislaron sólo tres análogos, pero ahora se sabe que el grupo está formado por al menos once compuestos identificados. Un problema importante asociado con todas estas toxinas nuevas es la extrema dificultad para el estudio de sus efectos tóxicos y mecanismos de acción, debido a la reducida cantidad disponible de toxinas purificadas. Por lo tanto, el estudio de los procedimientos para aislarlas a partir de moluscos contaminados o para sintetizarlas es de enorme importancia. En este trabajo diseñamos un procedimiento completo para obtener análogos de AZAs a partir de mejillones contaminados con toxinas DSP y azaspirácidos, mediante tres pasos consecutivos: un procedimiento de extracción para arrastrar las toxinas de los moluscos, una extracción en fase sólida (SPE) para limpiar las muestras y separar las toxinas DSP de los AZAs, y un método de HPLC a escala preparativa para aislar cada análogo. En todos los pasos se utiliza LC/MS para detectar y cuantificar las toxinas. Empleando este procedimiento se obtuvieron grandes cantidades de AZA1, AZA2, AZA3, AZA4 y AZA5, que se pueden utilizar en estudios futuros relacionados con dichas toxinas así como en la producción de materiales certificados y estándares.

## **Publicación II.2. Influencia de varias condiciones de pH y temperatura en la estabilidad de los azaspirácidos y su importancia en la purificación a escala preparativa y en los estudios toxicológicos.**

Los azaspirácidos (AZAs) son un grupo de toxinas descubiertas en mejillones procedentes de las costas irlandesas en 1995. La toxicidad de estos compuestos es materia continua de debate, debido a la rara ocurrencia de episodios tóxicos. No se ha descrito ni su mecanismo de acción ni su comportamiento farmacocinético, debido principalmente a la falta de estándares y materiales de referencia. Se han desarrollado procedimientos para aislar AZAs a partir de moluscos contaminados y para sintetizarlos; en particular, actualmente se están mejorando los métodos empleados para su purificación a escala preparativa. El presente trabajo describe la estabilidad de los AZAs en una serie de condiciones de pH y temperatura en

disolución metanólica, en tejido de molusco y en mezclas acuosas de ácidos y tejidos de moluscos. Los ácidos fuertes como el clorhídrico o el fórmico producen una degradación rápida del AZA1 a concentración mM, mientras que un ácido más débil como el acético necesita condiciones de temperatura más elevadas (70°C) y mayores concentraciones para mostrar efectos similares. Los AZAs presentaron una estabilidad mucho mayor en mezclas acuosas de ácidos y tejidos de moluscos, sugiriendo un efecto protector significativo de la matriz. Se ha propuesto un mecanismo para la degradación catalizada por ácidos, apoyado por las evidencias obtenidas mediante espectrometría de masas a partir de algunos de los productos de degradación. Las bases fuertes (hidróxido sódico) también muestran un efecto perjudicial en el AZA1; sin embargo, las bases más débiles (hidróxido amónico) no producen la degradación en 24 h a temperatura ambiente. Por último, se demostró que el potencial tóxico de los productos de degradación de los AZAs era significativamente menor que el de los compuestos originales, mediante estudios de citotoxicidad.



#### ***4. Conclusiones***

1. La polarización de la fluorescencia sirve para detectar la unión entre las fosfodiesteras y la yessotoxina.
2. La polarización de la fluorescencia permite cuantificar la yessotoxina, la homoyessotoxina y la hidroxiyessotoxina en una muestra. Para ello es indispensable seguir un procedimiento de limpieza con una extracción en cartucho de sílica y un filtro para pesos moleculares menores de 10000, precedido de una extracción con metanol o de una extracción con acetona y particiones con diclorometano.
3. La acetona y el metanol separan las toxinas diarreicas de los azaspirácidos mediante una extracción en fase sólida con cartucho de sílica.
4. La fase móvil MeOH/H<sub>2</sub>O/ AcOH (700/300/1) es la más adecuada para purificar mediante cromatografía líquida los azaspirácidos 1-5.
5. Elevadas temperaturas (mayores de 40°C) y valores de pH extremos (menores de 1 y mayores de 12) modifican la estructura molecular de los azaspirácidos en disolución y eliminan su actividad tóxica. Sin embargo, los tejidos de moluscos en los que se encuentran ejercen un efecto protector frente a dichas variables.

## ***5. Bibliografía***

- [1] Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2003, *Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes*. *Biochem Pharmacol*, 65: 193-208.
- [2] Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2004, *A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases*. *Anal Biochem*, 326: 93-9.
- [3] Alfonso, A., Roman, Y., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2005, *Azaspiracid-4 inhibits  $Ca^{2+}$  entry by stored operated channels in human T lymphocytes*. *Biochem Pharmacol*, 69: 1627-36.
- [4] Ardrey, R. E., 2003, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. John Wiley and Sons, Chichester.
- [5] Ares, I. R., Louzao, M. C., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2005, *Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins*. *J Exp Biol*, 208: 4345-54.
- [6] Ares, I. R., Louzao, M. C., Espiña, B., Vieytes, M. R., Miles, C. O., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2007, *Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics*. *Cell Physiol Biochem*, 19: 283-92.
- [7] Aune, T., Yasumoto, T. and Engeland, E., 1991, *Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes*. *J Toxicol Environ Health*, 34: 1-9.
- [8] Baden, D. G., Mende, T. J., Poli, M. A. and Block, R. E., 1984, *Toxins from Florida's red tide dinoflagellates, *Ptychodiscus brevis**; in Ragelis, E. P. (Ed.), *Seafood toxins*. ACS Symposium Series nº 262, 359-67. American Chemical Society, Washington.
- [9] Baden, D. G., Mende, T. J., Szmant, A. M., Trainer, V. L., Edwards, R. A. and Roszell, L. E., 1988, *Brevetoxin binding: molecular pharmacology versus immunoassay*. *Toxicon*, 26: 97-103.
- [10] Baden, D. G. and Adams, D. J., 2000, *Brevetoxins: chemistry, mechanism of action, and methods of detection*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 505-32. Marcel Dekker, New York.
- [11] Baden, D. G., Bourdelais, A. J., Jacocks, H., Michelliza, S. and Naar, J., 2005, *Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects*. *Environ Health Perspect*, 113: 621-5.

- [12] Bialojan, C. and Takai, A., 1988, *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics*. Biochem J, 256: 283-90.
- [13] Botana, L. M., Vieytes, M. R., Alfonso, A. and Louzao, M. C., 1996, *Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning*; in Nollet, L. M. L. (Ed.), *Handbook of food analysis. Residues and other food component analysis*, 1147-69. Marcel Dekker, New York.
- [14] Botana, L. M. (Ed.), 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Marcel Dekker, New York.
- [15] Bouaïcha, N., Hennion, M. C. and Sandra, P., 1997, *Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection*. Toxicon, 35: 273-81.
- [16] Bourdelais, A. J. and Baden, D. G., 2004, *Toxic brevetoxin complexes are in aqueous solutions [Abstract]*. Toxicologist, 78 (1-S): 807.
- [17] Briggs, L. R., Miles, C. O., Fitzgerald, J. M., Ross, K. M., Garthwaite, I. and Towers, N. R., 2004, *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of yessotoxin and its analogues*. J Agric Food Chem, 52: 5836-42.
- [18] Burgess, V. and Shaw, G., 2001, *Pectenotoxins-an issue for public health: a review of their comparative toxicology and metabolism*. Environ Int, 27: 275-83.
- [19] Burgess, V., Zhang, Y., Eaglesham, G., Tzang, C. H., Yang, Z., Shaw, G. R., Lam, P., Mengsu, Y. and Moore, M. R., 2003, *Investigation of changes in cell cycle distribution in cultured HepG<sub>2</sub> cells with the pectenotoxin-2 seco acids*; in Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J. L. and Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, 97-105. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- [20] Cagide, E., Louzao, M. C., Ares, I. R., Vieytes, M. R., Yotsu-Yamashita, M., Paquette, L. A., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2007, *Effects of a synthetic analog of polycavernoside A on human neuroblastoma cells*. Cell Physiol Biochem, 19: 185-94.
- [21] Caroppo, C., Congestri, R. and Bruno, M., 1999, *On the presence of Phalacroma rotundatum in the southern Adriatic Sea (Italy)*. Aquat Microb Ecol, 17: 301-10.
- [22] Chen, D. Z., Boland, M. P., Smillie, M. A., Klix, H., Ptak, C., Andersen, R. J. and Holmes, C. F., 1993, *Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment*. Toxicon, 31: 1407-14.
- [23] Cheng, Y. S., Zhou, Y., Irvin, C. M., Pierce, R. H., Naar, J., Backer, L. C., Fleming, L. E., Kirkpatrick, B. and Baden, D. G., 2005, *Characterization of*

- marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins. Environ Health Perspect*, 113: 638-43.
- [24] Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S. and Legrand, A.-M., 1999, *Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate Gambierdiscus spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. Marine Biology*, 135: 259-67.
  - [25] Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. and Viviani, R., 1998, *Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. Tetrahedron Lett*, 39: 8897-900.
  - [26] Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R. and Viviani, R., 2000, *A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea mussels. Eur J Org Chem*, 291-5.
  - [27] Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G. S., Tartaglione, L., Grillo, C. and Melchiorre, N., 2006, *The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean Ostreopsis ovata by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. Anal Chem*, 78: 6153-9.
  - [28] Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S. and Belin, C., 2000, *Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. Environ Res*, 84: 145-50.
  - [29] Daiguji, M., Satake, M., James, K. J., Bishop, A., MacKenzie, L., Naoki, H. and Yasumoto, T., 1998, *Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. Chem Lett*, 7: 653-4.
  - [30] Daiguji, M., Satake, M., Ramstad, H., Aune, T., Naoki, H. and Yasumoto, T., 1998, *Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway. Nat Toxins*, 6: 235-9.
  - [31] de la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R. and Botana, L. M., 2001, *Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. Biochem Pharmacol*, 61: 827-33.
  - [32] de la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2001, *Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes: modulation by yessotoxin, Ca<sup>2+</sup> channel blockers and kinases. Cell Signal*, 13: 711-6.
  - [33] Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A. and Pompei, M., 1999, *High levels of yessotoxin in mussels and*

*presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. Toxicon, 37: 1187-93.*

- [34] Draisci, R., Lucentini, L. and Masciori, A., 2000, *Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 289-324. Marcel Dekker, New York.
- [35] Estacion, M., 2000, *Ciguatera toxins: mechanism of action, and pharmacology of maitotoxin*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 473-504. Marcel Dekker, New York.
- [36] European Community, 2004, *Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*. O J L 139: 55-205.
- [37] European Community, 2004, *Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption*. O J L 139: 206-320.
- [38] European Community, 2005, *Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004*. O J L 338: 27-59.
- [39] European Economic Community, 1986, *Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes*. O J L 358: 1-28.
- [40] Farley, R. A., Schreiber, S., Wang, S. G. and Scheiner-Bobis, G., 2001, *A hybrid between Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is sensitive to palytoxin, ouabain, and SCH 28080*. J Biol Chem, 276: 2608-15.
- [41] Fernández, J. J., Cadenas, M. L., Souto, M. L., Trujillo, M. M. and Norte, M., 2002, *Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes*. Curr Med Chem, 9: 229-62.
- [42] Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogene, J. and Yasumoto, T., 2002, *Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas*; in Sar, E. A., Ferrario, M. E. and Reguera, B.

- (Eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, 77-120. Instituto Español de Oceanografía, Pontevedra.
- [43] Ferrari, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Malaguti, C., Tubaro, A., Poletti, R., Yasumoto, T., Fattorusso, E. and Rossini, G. P., 2004, *Structure-activity relationships of yessotoxins in cultured cells*. Chem Res Toxicol, 17: 1251-7.
  - [44] Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A. and Puiseux-Dao, S., 1996, *Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes*. Mutat Res, 361: 133-41.
  - [45] Fiorentini, C., Matarrese, P., Fattorossi, A. and Donelli, G., 1996, *Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells*. Toxicon, 34: 937-45.
  - [46] Fladmark, K. E., Serres, M. H., Larsen, N. L., Yasumoto, T., Aune, T. and Doskeland, S. O., 1998, *Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes*. Toxicon, 36: 1101-14.
  - [47] Fonfría, E. S., Vilariño, N., Campbell, K., Elliott, C., Haughey, S. A., Ben-Gigirey, B., Vieites, J. M., Kawatsu, K. and Botana, L. M., 2007, *Paralytic shellfish poisoning detection by surface plasmon resonance-based biosensors in shellfish matrixes*. Anal Chem, 79: 6303-11.
  - [48] Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.), 2004, *Marine biotoxins*. FAO Food and Nutrition Paper nº80. FAO, Roma.
  - [49] Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R. and Ottaviani, E., 2004, *Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice*. Toxicon, 43: 347-52.
  - [50] Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M. and Yasumoto, T., 1988, *Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin*. Jpn J Cancer Res, 79: 1089-93.
  - [51] Fukui, M., Murata, M., Inoue, A., Gawel, M. and Yasumoto, T., 1987, *Occurrence of palytoxin in the trigger fish Melichtys vidua*. Toxicon, 25: 1121-4.
  - [52] Furey, A., Moroney, C., Braña-Magdalena, A., Saez, M. J., Lehane, M. and James, K. J., 2003, *Geographical, temporal, and species variation of the polyether toxins, azaspiracids, in shellfish*. Environ Sci Technol, 37: 3078-84.
  - [53] Fuwa, H., Kainuma, N., Tachibana, K., Tsukano, C., Satake, M. and Sasaki, M., 2004, *Diverted total synthesis and biological evaluation of gambierol analogues*:



- elucidation of crucial structural elements for potent toxicity. Chemistry, 10: 4894-909.*
- [54] Gallitelli, M., Ungaro, N., Addante, L. M., Procacci, V., Silveri, N. G. and Sabba, C., 2005, *Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate*. *Jama*, 293: 2599-600.
  - [55] Gessner, B. D., 2000, *Neurotoxic toxins*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 65-90. Marcel Dekker, New York.
  - [56] Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G. P., Scalera, G., Yasumoto, T., Pietra, P. and Bigiani, A., 2005, *Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells*. *Toxicol Sci*, 85: 657-65.
  - [57] Gleibs, S. and Mebs, D., 1999, *Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals*. *Toxicon*, 37: 1521-7.
  - [58] Hallegraeff, G. M., 1995, *Harmful algal blooms: a global overview*; in Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33, 1-22. UNESCO, Paris.
  - [59] Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (Eds.), 1995, *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris.
  - [60] Hasle, G.-R. and Fryxell, G. A., 1995, *Taxonomy of diatoms*; in Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33, 339-64. UNESCO, Paris.
  - [61] Hess, P., Nguyen, L., Aasen, J., Keogh, M., Kilcoyne, J., McCarron, P. and Aune, T., 2005, *Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, Mytilus edulis, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. *Toxicon*, 46: 62-71.
  - [62] Holmes, M. J. and Lewis, R. J., 1994, *Purification and characterisation of large and small maitotoxins from cultured Gambierdiscus toxicus*. *Nat Toxins*, 2: 64-72.
  - [63] Holmes, M. J., Lewis, R. J., Jones, A. and Hoy, A. W., 1995, *Cooliatoxin, the first toxin from Coolia monotis (Dinophyceae)*. *Nat Toxins*, 3: 355-62.
  - [64] Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M. and Wright, J. L. C., 1995, *Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish*. *J Chem Soc Chem Commun*, 2159-61.

- [65] Hu, T., Curtis, M. J., Walter, J. A., McLachlan, J. L. and Wright, J. L. C., 1995, *Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate Prorocentrum maculosum: possible storage and excretion products*. Tetrahedron Lett, 36: 9273-6.
- [66] Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A. and Wright, J. L. C., 1996, *Characterization of biologically inactive spirolides E and F: Identification of the spirolide pharmacophore*. Tetrahedron Lett, 37: 7671-4.
- [67] Hu, T., DeFreitas, A. S. W., Curtis, J. M., Oshima, Y., Walter, J. A. and Wright, J. L. C., 1996, *Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from Prorocentrum maculosum*. J Nat Prod, 59: 1010-4.
- [68] Hungerford, J. M. and Wekell, M. M., 1992, *Analytical methods for marine toxins*; in Tu, A. T. (Ed.), Food Poisoning Handbook of Natural Toxins, 416-73. Marcel Dekker, New York.
- [69] James, K. J., Lehane, M., Moroney, C., Fernández-Puente, P., Satake, M., Yasumoto, T. and Furey, A., 2002, *Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk of acute human intoxications*. Food Addit Contam, 19: 555-61.
- [70] James, K. J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M. and Furey, A., 2003, *Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning*. Toxicon, 41: 145-51.
- [71] Katikou, P., 2008, *Palytoxin and analogues: ecobiology and origin, chemistry, metabolism, and chemical analysis*; in Botana, L. M. (Ed.), Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. 2nd edition, 631-63. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- [72] Kerr, D. S., Briggs, D. M. and Saba, H. I., 1999, *A neurophysiological method of rapid detection and analysis of marine algal toxins*. Toxicon, 37: 1803-25.
- [73] Kita, M., Kondo, M., Koyama, T., Yamada, K., Matsumoto, T., Lee, K. H., Woo, J. T. and Uemura, D., 2004, *Symbioimine exhibiting inhibitory effect of osteoclast differentiation, from the symbiotic marine dinoflagellate Symbiodinium sp.* J Am Chem Soc, 126: 4794-5.
- [74] Kita, M., Ohishi, N., Washida, K., Kondo, M., Koyama, T., Yamada, K. and Uemura, D., 2005, *Symbioimine and neosymbioimine, amphoteric iminium metabolites from the symbiotic marine dinoflagellate Symbiodinium sp.* Bioorg Med Chem, 13: 5253-8.
- [75] Kleivdal, H., Kristiansen, S. I., Nilsen, M. V. and Briggs, L., 2007, *Single-laboratory validation of the biosense direct competitive enzyme-linked*

- immunosorbent assay (ELISA) for determination of domoic acid toxins in shellfish. J AOAC Int*, 90: 1000-10.
- [76] Kleivdal, H., Kristiansen, S. I., Nilsen, M. V., Goksoyr, A., Briggs, L., Holland, P. and McNabb, P., 2007, *Determination of domoic acid toxins in shellfish by biosense ASP ELISA-a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J AOAC Int*, 90: 1011-27.
  - [77] Kogure, K., Tamplin, M. L., Simidu, U. and Colwell, R. R., 1988, *A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon*, 26: 191-7.
  - [78] Konishi, M., Yang, X., Li, B., Fairchild, C. R. and Shimizu, Y., 2004, *Highly cytotoxic metabolites from the culture supernatant of the temperate dinoflagellate Protoceratium cf. reticulatum. J Nat Prod*, 67: 1309-13.
  - [79] Krock, B., Tillmann, U., John, U. and Cembella, A. D., 2008, *Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. Harmful Algae*, In press.
  - [80] Lagos, N. W. and Andrinolo, D., 2000, *Paralytic shellfish poisoning (PSP): Toxicology and kinetics*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 203-16. Marcel Dekker, New York.
  - [81] Lakowicz, J. R., 1999, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
  - [82] Lawrence, J. F., Charbonneau, C. F., Menard, C., Quilliam, M. A. and Sim, P. G., 1989, *Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists. J Chromatogr*, 462: 349-56.
  - [83] Lawrence, J. F., Charbonneau, C. F. and Menard, C., 1991, *Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study. J Assoc Off Anal Chem*, 74: 68-72.
  - [84] Lawrence, J. F., Niedzwiadek, B. and Menard, C., 2004, *Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: interlaboratory study. J AOAC Int*, 87: 83-100.
  - [85] Lefebvre, K. A., Powell, C. L., Busman, M., Doucette, G. J., Moeller, P. D., Silver, J. B., Miller, P. E., Hughes, M. P., Singaram, S., Silver, M. W. and Tjeerdema, R. S., 1999, *Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. Nat Toxins*, 7: 85-92.

- [86] Legrand, A. M. and Lotte, C. J., 1994, *Detection of ciguatoxic fish by using the binding property of ciguatoxins to voltage-dependent sodium channels*. Mem Qd Mus, 34: 576.
- [87] Lehane, L., 2000, *Ciguatera update*. Med J Aust, 172: 176-9.
- [88] Lehane, L. and Lewis, R. J., 2000, *Ciguatera: recent advances but the risk remains*. Int J Food Microbiol, 61: 91-125.
- [89] Leira, F., Cabado, A. G., Vieytes, M. R., Román, Y., Alfonso, A., Botana, L. M., Yasumoto, T., Malaguti, C. and Rossini, G. P., 2002, *Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells*. Biochem Pharmacol, 63: 1979-88.
- [90] Lewis, R. J., Holmes, M. J., Alewood, P. F. and Jones, A., 1994, *Ionspray mass spectrometry of ciguatoxin-1, maitotoxin-2 and -3, and related marine polyether toxins*. Nat Toxins, 2: 56-63.
- [91] Lewis, R. J., Molgó, J. and Adams, D. J., 2000, *Ciguatera Toxins: Pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 419-48. Marcel Dekker, New York.
- [92] Lewis, R. J., 2001, *The changing face of ciguatera*. Toxicon, 39: 97-106.
- [93] Llamas, N. M., Stewart, L., Fodey, T., Higgins, H. C., Velasco, M. L., Botana, L. M. and Elliott, C. T., 2007, *Development of a novel immunobiosensor method for the rapid detection of okadaic acid contamination in shellfish extracts*. Anal Bioanal Chem, 389: 581-7.
- [94] Louzao, M. C., Cagide, E., Vieytes, M. R., Sasaki, M., Fuwa, H., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2006, *The sodium channel of human excitable cells is a target for gambierol*. Cell Physiol Biochem, 17: 257-68.
- [95] Lu, C.-K., Lee, G.-H., Huang, R. and Cho, H.-N., 2001, *Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic Prorocentrum sp. of Taiwan*. Tetrahedron Lett, 42: 1713-6.
- [96] Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R. and Moestrup, O., 1994, *Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in Pseudonitzschia seriata (Bacillariophyceae) in Europe*. Phycologia, 33: 475-8.
- [97] Luu, H. A., Chen, D. Z., Magoon, J., Worms, J., Smith, J. and Holmes, C. F., 1993, *Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels*. Toxicon, 31: 75-83.

- [98] MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A. and Suzuki, T., 2002, *Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (Perna canaliculus), revealed by LC-MS/MS analysis*. *Toxicon*, 40: 1321-30.
- [99] Malaguti, C., Ciminiello, P., Fattorusso, E. and Rossini, G. P., 2002, *Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells*. *Toxicol In Vitro*, 16: 357-63.
- [100] McMahon, T. and Silke, J., 1996, *Winter toxicity of unknown aetiology in mussels*. *Harmful Algae News*, 14: 2.
- [101] McMahon, T. and Silke, J., 1998, *Re-occurrence of winter toxicity*. *Harmful Algae News*, 17: 12.
- [102] McMaster, M. C., 2005, *LC/MS: a practical user's guide*. John Wiley and Sons, New Jersey.
- [103] Miles, C. O., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M. A., Naustvoll, L. J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D. J. and Cooney, J. M., 2004, *A novel pectenotoxin, PTX-12, in Dinophysis spp. and shellfish from Norway*. *Chem Res Toxicol*, 17: 1423-33.
- [104] Miles, C. O., Samdal, I. A., Aasen, J., Jensen, D. J., Quilliam, M. A., Petersen, D., Briggs, L. M., Wilkins, A. L., Rise, F., Cooney, J. M. and MacKenzie, A. L., 2005, *Evidence for numerous analogs of yessotoxin in Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 4: 1075-91.
- [105] Molgó, J., Girard, E. and Benoit, E., 2007, *Cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins*; in Botana, L. M. (Ed.), *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*, 319-35. Blackwell Publishing, Iowa.
- [106] Mons, M. N., Van Egmond, H. P. and Speijers, G. J. A., 1998, *Paralytic shellfish poisoning: A review*. RIVM Report 388802 005. RIVM.
- [107] Moore, R. E. and Bartolini, G., 1981, *Structure of palytoxin*. *J Am Chem Soc*, 103: 2491-4.
- [108] Mori, Y., Nogami, K., Hayashi, H. and Noyori, R., 2003, *Sulfonyl-stabilized oxiranyllithium-based approach to polycyclic ethers. Convergent synthesis of the ABCDEF-ring system of yessotoxin and adriatoxin*. *J Org Chem*, 68: 9050-60.
- [109] Mountfort, D. O., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P. and Hannah, D. J., 1999, *Evaluation of the fluorometric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels*. *Toxicon*, 37: 909-22.
- [110] Munday, R., 2008, *Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines*;

- in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. 2nd edition, 581-94. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- [111] Munday, R., 2008, *Occurrence and toxicology of palytoxins*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. 2nd edition, 693-713. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
  - [112] Muramatsu, I., Uemera, D., Fujiwara, M. and Narahashi, T., 1984, *Characteristics of palytoxin-induced depolarization in squid axons*. *J Pharmacol Exp Ther*, 231: 488-94.
  - [113] Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S. and Yasumoto, T., 1987, *Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. *Tetrahedron Lett*, 28: 5869-72.
  - [114] Murata, M., Naoki, H., Matsunaga, S., Satake, M. and Yasumoto, T., 1994, *Structure and partial stereochemical assignments for maitotoxin, the most toxic and largest natural non-biopolymer*. *J Am Chem Soc*, 116: 7098-107.
  - [115] Niessen, W. M. A., 1999, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York.
  - [116] Nzoughet, K. J., Hamilton, J. T. G., Floyd, S. D., Douglas, A., Nelson, J., Devine, L. and Elliott, C. T., 2008, *Azaspiracid: First evidence of protein binding in shellfish*. *Toxicon*, 51: 1255-63.
  - [117] Ogino, H., Kumagai, M. and Yasumoto, T., 1997, *Toxicologic evaluation of yessotoxin*. *Nat Toxins*, 5: 255-9.
  - [118] Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. and Yasumoto, T., 1999, *Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism*. *Toxicon*, 37: 55-65.
  - [119] Pazos, M. J., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., Vieites, J. M. and Botana, L. M., 2004, *Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions*. *Anal Biochem*, 335: 112-8.
  - [120] Pazos, M. J., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2005, *Kinetic analysis of the interaction between yessotoxin and analogues and immobilized phosphodiesterases using a resonant mirror optical biosensor*. *Chem Res Toxicol*, 18: 1155-60.
  - [121] Peng, Y. G., Taylor, T. B., Finch, R. E., Switzer, R. C. and Ramsdell, J. S., 1994, *Neuroexcitatory and neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid*. *Neuroreport*, 5: 981-5.

- [122] Perrin, M. F., 1926, *Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité*. J Phys Radium, 7: 390-401.
- [123] Pierce, R. H., Henry, M. S., Blum, P. C., Hamel, S. L., Kirkpatrick, B., Cheng, Y. S., Zhou, Y., Irvin, C. M., Naar, J., Weidner, A., Fleming, L. E., Backer, L. C. and Baden, D. G., 2005, *Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins*. Harmful Algae, 4: 965-72.
- [124] Pierotti, S., Malaguti, C., Milandri, A., Poletti, R. and Rossini, G. P., 2003, *Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples*. Anal Biochem, 312: 208-16.
- [125] Poli, M. A., Mende, T. J. and Baden, D. G., 1986, *Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes*. Mol Pharmacol, 30: 129-35.
- [126] Quilliam, M. A., Thomas, K. and Wright, J. L., 1998, *Analysis of domoic acid in shellfish by thin-layer chromatography*. Nat Toxins, 6: 147-52.
- [127] Quilliam, M. A., 2003, *Chemical methods for lipophilic shellfish toxins*; in Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, 211-45. UNESCO, Paris.
- [128] Ramsdell, J. S., 2007, *The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity*; in Botana, L. M. (Ed.), *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*, 223-50. Blackwell Publishing, Iowa.
- [129] Ravn, H., 1995, *HAB Publication Series Volume 1. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)*. IOC Manuals and Guides No. 31, Vol. 1. UNESCO, Paris.
- [130] Rehmann, N., Hess, P. and Quilliam, M. A., 2008, *Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (Mytilus edulis) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 22: 549-58.
- [131] Román, Y., Alfonso, A., Louzao, M. C., de la Rosa, L. A., Leira, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2002, *Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets*. Cell Signal, 14: 703-16.
- [132] Román, Y., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T. and Botana, L. M., 2004, *Effects of azaspiracids 2 and 3 on intracellular cAMP, [Ca<sup>2+</sup>], and pH*. Chem Res Toxicol, 17: 1338-49.

- [133] Ronzitti, G., Hess, P., Rehmann, N. and Rossini, G. P., 2007, *Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells*. *Toxicol Sci*, 95: 427-35.
- [134] Rossini, G. P., 2005, *Functional assays in marine biotoxin detection*. *Toxicology*, 207: 451-62.
- [135] Samdal, I. A., Naustvoll, L. J., Olseng, C. D., Briggs, L. R. and Miles, C. O., 2004, *Use of ELISA to identify Protoceratium reticulatum as a source of yessotoxin in Norway*. *Toxicon*, 44: 75-82.
- [136] Sar, E. A., Ferrario, M. E. and Reguera, B. (Eds.), 2002, *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Pontevedra.
- [137] Satake, M., Murata, M. and Yasumoto, T., 1993, *Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate Gambierdiscus toxicus*. *J Am Chem Soc*, 115: 361-2.
- [138] Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y. and Yasumoto, T., 1996, *Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops*. *Tetrahedron Lett*, 37: 5955-8.
- [139] Satake, M., MacKenzie, L. and Yasumoto, T., 1997, *Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin*. *Nat Toxins*, 5: 164-7.
- [140] Satake, M., Tubaro, A., Lee, J. S. and Yasumoto, T., 1997, *Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea*. *Nat Toxins*, 5: 107-10.
- [141] Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J. and Yasumoto, T., 1998, *Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc*, 120: 9967-8.
- [142] Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H. F. and Yasumoto, T., 1995, *Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, Gymnodinium sp.* *Tetrahedron Lett*, 36: 7093-6.
- [143] Shea, D., 1997, *Analysis of brevetoxins by micellar electrokinetic capillary chromatography and laser-induced fluorescence detection*. *Electrophoresis*, 18: 277-83.
- [144] Shimizu, Y., 2000, *Chemistry and mechanism of action*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 151-72. Marcel Dekker, New York.



- [145] Shumway, S. E., 1995, *Phycotoxin related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors*. Rev Fish Sci, 3: 1-31.
- [146] Sierra Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A. and Ochoa, J. L., 1997, *Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading*. Toxicon, 35: 447-53.
- [147] Simon, J. F. and Vernoux, J. P., 1994, *Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate*. Nat Toxins, 2: 293-301.
- [148] Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A., 2003, Principios de análisis instrumental. 5ª edición. McGraw Hill, Madrid.
- [149] Souto, M. L., Fernandez, J. J., Franco, J. M., Paz, B., Gil, L. V. and Norte, M., 2005, *Glycoyessotoxin a, a new yessotoxin derivative from cultures of Protoceratium reticulatum*. J Nat Prod, 68: 420-2.
- [150] Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R. and Bubbs, M. R., 1999, *New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton*. Microsc Res Tech, 47: 18-37.
- [151] Stewart, M., Blunt, J. W., Munro, M. H., Robinson, W. T. and Hannah, D. J., 1997, *The absolute stereochemistry of the New Zealand shellfish toxin gymnodimine*. Tetrahedron Lett, 38: 4889-90.
- [152] Suárez-Gómez, B., Souto, M. L., Norte, M. and Fernández, J. J., 2001, *Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative*. J Nat Prod, 64: 1363-4.
- [153] Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H. and Yamasaki, M., 1998, *Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate Dinophysis fortii by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops*. J Chromatogr A, 815: 155-60.
- [154] Suzuki, T., Ota, H. and Yamasaki, M., 1999, *Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop Patinopecten yessoensis*. Toxicon, 37: 187-98.
- [155] Suzuki, T., 2008, *Chemistry, metabolism, and chemical detection methods of pectenotoxins*; in Botana, L. M. (Ed.), Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. 2nd edition, 343-59. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.

- [156] Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K. and Uemura, D., 2001, *Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve Pteria penguin*. Tetrahedron Lett, 42: 3495-7.
- [157] Takahashi, M., Tatsumi, M., Ohizumi, Y. and Yasumoto, T., 1983, *Ca<sup>2+</sup> channel activating function of maitotoxin, the most potent marine toxin known, in clonal rat pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 258: 10944-9.
- [158] Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G. and Yasumoto, T., 1992, *Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship*. Biochem J, 284 (Pt 2): 539-44.
- [159] Takemoto, T. and Daigo, K., 1958, *Constituents of Chondria armata*. Chem Pharmaceutical Bull, 6: 578-80.
- [160] Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M. and Yasumoto, T., 1990, *Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from Patinopecten yessoensis and of a desulfated derivative*. Toxicon, 28: 1095-104.
- [161] Todd, E. C. D., 1993, *Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review*. J Food Protection, 56: 69-83.
- [162] Torgersen, T., Bremnes, N. B., Rundberget, T. and Aune, T., 2008, *Structural confirmation and occurrence of azaspiracids in Scandinavian brown crabs (Cancer pagurus)*. Toxicon, 51: 93-101.
- [163] Torigoe, K., Murata, M., Yasumoto, T. and Iwashita, T., 1988, *Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, Prorocentrum lima*. J Am Chem Soc, 110: 7876-7.
- [164] Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P. and Hecht, G., 1997, *The toxin of diarrheic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability*. Gastroenterology, 112: 100-8.
- [165] Twiner, M. J., Hess, P., Dechraoui, M. Y., McMahon, T., Samons, M. S., Satake, M., Yasumoto, T., Ramsdell, J. S. and Doucette, G. J., 2005, *Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines*. Toxicon, 45: 891-900.
- [166] Twiner, M. J., Ryan, J. C., Morey, J. S., Smith, K. J., Hammad, S. M., Van Dolah, F. M., Hess, P., McMahon, T., Satake, M., Yasumoto, T. and Doucette, G. J., 2008, *Transcriptional profiling and inhibition of cholesterol biosynthesis in human T lymphocyte cells by the marine toxin azaspiracid*. Genomics, 91: 289-300.

- [167] Uemura, D., Chou, T., Haino, A., Nagatsu, S., Fukuzawa, S., Zheng, S.-Z. and Chen, H. S., 1995, *Pinnatoxin: A toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve Pinna muricata*. J Am Chem Soc, 117: 1155-6.
- [168] Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y. and Yasumoto, T., 1995, *Palytoxin analogs from the dinoflagellate Ostreopsis siamensis*. J Am Chem Soc, 117: 5389-90.
- [169] Vale, C., Gómez-Limia, B., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Vieytes, M. R. and Botana, L. M., 2007, *The c-Jun-N-terminal kinase is involved in the neurotoxic effect of azaspiracid-1*. Cell Physiol Biochem, 20: 957-66.
- [170] Vale, C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Gómez-Limia, B., Alfonso, A., Vieytes, M. R. and Botana, L. M., 2007, *Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study*. J Med Chem, 50: 356-63.
- [171] Van Dolah, F. M., Finley, E. L., Haynes, B. L., Doucette, G. J., Moeller, P. D. and Ramsdell, J. S., 1994, *Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins*. Nat Toxins, 2: 189-96.
- [172] Van Dolah, F. M., Leighfield, T. A., Haynes, B. L., Hampson, D. R. and Ramsdell, J. S., 1997, *A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor*. Anal Biochem, 245: 102-5.
- [173] Van Egmond, H. P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G. J. A. and Waldock, M., 1993, *Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. J Nat Toxins, 2: 41-83.
- [174] Vieytes, M. R., Fontal, O. I., Leira, F., Baptista de Sousa, J. M. and Botana, L. M., 1997, *A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins*. Anal Biochem, 248: 258-64.
- [175] Vilariño, N., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Cagide, E., Ares, I. R., Louzao, M. C., Vieytes, M. R. and Botana, L. M., 2006, *Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies*. Chem Res Toxicol, 19: 1459-66.
- [176] Viviani, R., 1992, *Eutrophication, marine biotoxins, human health*. Sci Total Environ, Suppl: 631-62.
- [177] Wilkins, A. L., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F. and Miles, C. O., 2006, *Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (Mytilus edulis) from Ireland*. J Agric Food Chem, 54: 5672-8.

- [178] Wright, J. L. C. and Quilliam, M. A., 1995, *Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons*; in Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33, 113-33. UNESCO, Paris.
- [179] [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).
- [180] [www.hidex.com](http://www.hidex.com).
- [181] [www.jolley.com](http://www.jolley.com).
- [182] [www.waters.com](http://www.waters.com).
- [183] Yasumoto, T., Bagnis, R. and Vernoux, J. P., 1976, *Toxicity of Surgeonfishes. II - properties of the principle water-soluble toxin*. Bull Jap Soc Sci Fish, 42: 359-65.
- [184] Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G. K. and Clardy, J., 1984, *Diarrhetic shellfish poisoning*; in Ragelis, E. P. (Ed.), *Seafood toxins*. ACS symposium series n° 262, 207-14. American Chemical Society, Washington.
- [185] Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K. and Clardy, J., 1985, *Diarrhetic shellfish toxins*. Tetrahedron, 41: 1019-25.
- [186] Yasumoto, T. and Takizawa, A., 1997, *Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography*. Biosci Biotechnol Biochem, 61: 1775-7.
- [187] Yasumoto, T., 2000, *Historic considerations regarding seafood safety*; in Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, 1-18. Marcel Dekker, New York.
- [188] Yotsu-Yamashita, M., Haddock, R. L. and Yasumoto, T., 1993, *Polycavernoside A: a novel glycosidic macrolide from the red alga Polycavernosa tsudai (Gracilaria edulis)*. J Am Chem Soc, 115: 1147-8.
- [189] Yotsu-Yamashita, M., Seki, T., Paul, V. J., Naoki, H. and Yasumoto, T., 1995, *Four new analogs of polycavernoside A*. Tetrahedron Lett, 36: 5563-6.
- [190] Yotsu-Yamashita, M., Abe, K., Seki, T., Fujiwara, K. and Yasumoto, T., 2007, *Polycavernoside C and C2, the new analogs of the human lethal toxin polycavernoside A, from the red alga, Gracilaria edulis*. Tetrahedron Lett, 48: 2255-9.

